

DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR
DER INTERMEDIÄRFORMEN BEI DER REPLIKATION
DES KLEINEN RNA-PHAGEN M 12 IN VIVO

Till Uwe Keil

1975

Aus der Abteilung für Virusforschung des Max-Planck-
Institutes für Biochemie in Martinsried bei München
Direktor Prof.Dr.Dr. P.H. Hofschneider

Die Sekundärstruktur
der Intermediärformen bei der Replikation
des kleinen RNA-Phagen M12 i n v i v o

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von Till Uwe Keil aus Frankenberg

1. Berichterstatter: Prof.Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Dr. Horst Schmieger

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 1975

Für Elsa Feligita



Van der Velden

Van der Velden

Van der Velden

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1972 bis November 1974 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München und Martinsried unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Hofschneider bin ich für die Anregung zum Thema der Arbeit sowie für ständige fruchtbare Anleitung und Diskussion sehr zu Dank verpflichtet. Den Kollegen Dr. Karl Wanner und Dr. Barbara Leipold bin ich Dank für kritische Diskussion schuldig.

Frl. Helga Riesemann half mit großem Geschick bei einer Reihe von Experimenten.

Herr Prof. Dr. Bernt Linzen förderte die Arbeit großzügig seitens der Fakultät.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einführung und Übersicht	13
I. Einführung	13
A. Allgemeiner Teil	13
B. Spezielle Einführung	15
1. Systematik und Morphologie des Phagen M12	15
2. Biologie des Phagen M12	16
3. Die Replikation der Phagen-RNA	18
a. Einführung in die Fragestellung	18
b. Zwischenstufen bei der RNA-Replikation	20
c. RNA-Replikation <u>in vitro</u>	21
d. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	22
II. Übersicht der nachfolgenden experimentellen Arbeit	24
Material und Methoden	26
1. Verwendete Materialien	26
2. Phagen und Bakterien	26
3. Puffer und Bakterienmedien	27
4. Bestimmung der Phagenzahl [Plaquetest]	27
5. Bestimmung des Bakterientiters	28
6. Messung der Proteinkonzentration	28
7. Ermittlung des DNA-Anteils von Nukleinsäurepräparationen	28
8. Nachweis lysogener Phagen in einer Bakterienkultur	29
9. Gewinnung und Anreicherung von RNA-Phagen	29
10. Anreicherung radioaktiv markierter Phagen	30
11. Infektion mit radioaktiv markierten Phagen	31
12. Präparation infektiöser Phagen-RNA	31
13. Präparation von RNAase III	32
14. Präparation von doppelsträngiger RNA	33
a. Doppelsträngige M12-RNA	33
b. ^3H poly U · poly A	34
15. Selektive radioaktive Markierung von intrazellulärer Phagen-RNA	35
16. Bereitung eines Rohextraktes aus Bakterien	36
17. Herstellung der 'Gereinigten Nukleinsäure-Fraktion'	36

	Seite
18. Untersuchung des Nuklease-Gehaltes von Zellextrakten	37
a. Gehalt an RNAase I	37
b. Gehalt an RNAase III	37
19. Funktionstest der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	38
20. Strukturbestimmung von RNA durch Behandlung mit RNAase aus Rinderpankreas und RNAase III	38
a. RNAase aus Rinderpankreas	38
b. RNAase III aus <u>Escherichia coli</u>	38
21. Auftrennung radioaktiv markierter RNA nach ihrer Sedimentationseigenschaft im linearen Rohrzuckergradienten	39
22. Hybridisierung von RNA	40
23. Bestimmung der Radioaktivität	40
Experimenteller Teil	42
I. Vorversuche	42
A. Beschreibung der <u>E.coli</u> Mutante AB 301-105	42
1. Fragestellung	42
2. Wachstum in verschiedenen Medien	42
3. Vermehrung von RNA- und DNA-Phagen	44
4. Gehalt von RNAase I und RNAase III im Zellextrakt	44
5. Sensitivität für Rifampizin	46
B. Kontrolle der M12-Synthese in der Mutante <u>E.coli</u> AB 301-105	49
1. Fragestellung der Experimente	49
2. Eigenschaften der selektiv markierten M12-RNA	49
II. Hauptteil: Die Sekundärstruktur der Intermediärformen bei der Replikation des Phagen M12	53
A. Resistenz replikativer RNA gegen pankr. RNAase und RNAase III im Zellextrakt der infizierten Bakterien	53
1. Vorbemerkung über Pulsmarkierung von RNA	53
2. Meßergebnisse	54
3. Zwischendiskussion der Resultate	54
B. Renaturierung nativer replikativer M12-RNA durch Wärmeeinwirkung	55
1. Fragestellung der Experimente	55
2. Meßergebnisse	56
3. Zwischendiskussion der Resultate	57

	Seite
C. Renaturierung nativer replikativer M12-RNA bei der Phenolextraktion der Nukleinsäuren	58
1. Einführung in die folgenden Experimente	58
2. Meßergebnisse	59
3. Zwischendiskussion	59
D. Sekundärstruktur der einzelnen Intermediärformen bei der M12-Replikation [RI und RF]	60
1. Fragestellung	60
2. Experimentelle Ergebnisse	60
3. Zwischendiskussion der gefundenen Resultate	63
E. Sekundärstruktur von M12-RNA, die für 15 Minuten radioaktiv markiert wurde	64
1. Fragestellung	64
2. Experimenteller Befund	64
3. Vorläufige Diskussion der Resultate	66
F. Bestimmung der Sekundärstruktur der negativen und positiven replikativen Intermediärformen [Minus- und Plusstrang-synthetisierender RI]	68
1. Einführung in das Problem und die Lösungsmöglichkeiten	68
2. Experimentelle Ergebnisse	72
a. Experimente mit parental mark. Phagen	72
α. Strukturaufklärung der neg. RI's	72
β. Zwischendiskussion	74
b. Hybridisierungsexperimente	75
α. Strukturaufklärung der neg. RI's	75
β. Zwischendiskussion	78
G. Anteil der parentalen RNA, die wieder in Tochterphagen eingebaut wird	79
 Diskussion	
A. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	84
B. Reflexion der verwendeten Methoden	86
1. Selektive Synthese von virusspezifischer RNA in Gegenwart von Rifampizin	86
2. Bereitung des Zellextraktes durch Zertrümmern der Bakterienwände mit Glasperlen	87
3. Bestimmung der Sekundärstruktur der Intermediärformen mit Ribonukleasen	88
4. Bandsedimentation der RNA	89

	Seite
C. Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen	90
D. Folgerungen aus den Resultaten dieser Arbeit: Das Modell für die Replikation der RNA kleiner RNA-Bakteriophagen	92
E. Offene Fragen	93
Zusammenfassung	97
A. Ergebnisse dieser Arbeit	97
B. Verwendete Methoden	97
Literaturverzeichnis	98
Lebenslauf	
Verzeichnis des Inhalts	7

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

^{14}C	radioaktiver Kohlenstoff
Ci	Curie
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle in der Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid [$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$]
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS) als int. Symbol für DNS
DNAase	pankreatische Desoxyribonuklease
E.C.	Enzymklassifikation [Liste der bekannten Enzyme nach 'Comprehensive Biochemistry', Bd.13, 2.Auf. 1965]
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure als Natriumsalz
^3H	Tritium
mCi	Millicurie
MG	Molekulargewicht [vielfaches von H]
M	molar [Mol/l]
ml	Milliliter
mM	millimolar [Millimol/l]
mmol	Millimol
moi	Multiplizität der Infektion [Viren/Bakterien]
mRNA	Boten-RNA
N	normal [Grammäquivalent/l]
^{32}P	radioaktives Phosphat
OD_{260}	optische Dichte bei 260nm Wellenlänge
pfu	Bakteriophagen, die in der Lage sind, ein Loch im Bakterienrasen auszubilden [=biolog.aktive Phagen]
RF	Replikative Form [doppelsträngige Intermediärform]
RI	Replikative Intermediärform [mit unfertigen(m) Produktstrang(strängen)]
RNA	Ribonukleinsäure (RNS) als intern. Symbol für RNS
RNAase	Ribonuklease
RNAase I	einzelstrangspezifische RNAase aus <u>E. coli</u>
RNAase III	doppelstrangspezifische RNAase aus <u>E.coli</u>
S	Einheit der Sedimentation nach SVEDBERG [10^{-13} sek.]
'Salz'	'niedriges Salz', 'hohes Salz' meint ein Ionenmilieu mit weniger als 0,05 M bzw. mehr als 0,1 M Gesamtionenkonzentration
SDS	Dodecylnatriumsulfat [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$]
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-Methan

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Modell der RNA-Replikation nach <u>in-vivo</u> - und <u>in-vitro</u> - Daten sowie Erklärung der Sedimentationseigenschaften	23
Linearer Rohrzuckergradient mit M12-RNA (2)	33
Elutionsprofil doppelstr. RNA von Whatman-Säule (3)	33
Wachstum von AB 301 und 301-105 in M-3 Medium (4 a)	42
Wachstum von AB 301 und 301-105 in CW/2 Medium (4 b)	43
Charakterisierung von E.c. 301 und 301-105 [1]	43
Ribonukleaseaktivitäten in E.c. 301 und 301-105 [2]	45
Wachstumsprofil von E.c. 301-105 ± Rifampizin (5)	46
Einbaureate von Urazil in inf. und uninif. Bakterien (6)	47
Test der DNA-abh. RNA-Polymerase [3]	48
Gesamtsynthese von M12-RNA in Gegenw. von Rifampizin	50
Sedimentationsprofil pulsmark. RNA nach Phenol (8)	50
Resistenz pulsmark. RNA gegen RNAase I u. III (9 a)	54
Renaturierung pulsmark. RNA durch Wärme (9 b und c)	56
Sedimentationsprofil pulsmarkierter RNA nach Wärme	57
Sedimentationsprofil pulsmarkierter RNA vor und nach Phenolisierung (11)	61
Auswertung von Abb. 11 [4]	62
Sedimentationsprofil langzeitmarkierter RNA vor und nach Phenolisierung (12)	65
Auswertung von Abb. 12 [5]	65
Initiation der RNA-Synthese am Plusstrang (13)	68
Sedimentationsprofil von replikativer RNA aus paren- tal infizierten (³² P-M12) Zellen (14)	72
Auswertung von Abb. 14 [6]	72
Hybridisierung von replikativer RNA nach Phenol (15)	75
Auswertung von Abb. 15 [7]	76
Hybridisierung von replikativer, nativer RNA (16)	77
Renaturierungskinetik von M12-RF (17)	78
Sedimentationsprofil (50 min) von parental-markierter M12 RNA (18)	80
Sedimentationsprofile von RNA aus parental markierten Phagen, mit denen infiziert wurde zu verschiedenen Zeiten nach Abscheren der Phagen (19)	82
Auswertung von Abb. 19 [8]	82
Übersicht über den Replikationszyklus des kleinen RNA-Phagen M12, wie es sich nach den Ergebnissen die- ser Arbeit ergibt (20)	94
(Abbildungen), [Tabellen]	Seite

Einführung und Übersicht

I. Einführung

A. Allgemeiner Teil

AVERY konnte 1944 zeigen, daß Nukleinsäuren und nicht Proteine Träger der Vererbung sind. Seither hat sich das Interesse der biologisch orientierten Naturwissenschaften immer mehr dieser Stoffklasse zugewandt. Die Struktur der doppelhelikalen DNA als Haupterbträger wurde entschlüsselt. Die wichtigsten Mechanismen der Vervielfältigung, Weitergabe und Realisierung der auf der DNA gespeicherten Erbanlagen sind heute verstanden.

Viren bieten sich ausgezeichnet als Untersuchungsobjekte für molekularbiologische Fragestellungen an. Sie enthalten nämlich eine relativ kleine, leicht isolierbare Nukleinsäure als Erbträger. Insbesondere Bakterienviren ermöglichen eine rasche Anreicherung bestimmter Klassen von Nukleinsäuren. Sie wurden 1915 von TWORT entdeckt. 1917 beschrieb D'HERELLE sie als Bakteriophagen. Zunächst erweckten sie medizinische Hoffnungen für eine gezielte Therapie bakterieller Infektionskrankheiten. Diese Hoffnungen erfüllten sich nicht. Erst Anfang der 40er Jahre wurde das 'Bakterien-Phagen-System' von einer Gruppe junger Physiker und Chemiker als ideales Versuchsobjekt für biologische Untersuchungen auf makromolekularer Ebene entdeckt. Im Mittelpunkt dieser Gruppe standen HERSEY, LURIA und DELBRÜCK, die sich durch die Phagen-Sommerkurse in Cold Spring Harbor allmählich eine außerordentliche Resonanz verschafften. Tatsächlich zehrt noch heute die molekularbiologische Forschung von den Impulsen ihrer Gründergeneration.

Die ersten isolierten Bakterienviren waren DNA-haltig. Ihre Erbsubstanz ließ sich leichter als die komplexen Chromosomen der Zelle rein darstellen und im Stoffwechsel verfolgen. Diese Phagen ermöglichten so vor allem

das Studium der DNA-Reduplikation und der Transkription der DNA in Boten-RNA (mRNA).

Im Sommer 1961 wurde dann von LOEB und ZINDER eine Gruppe von Bakteriophagen beschrieben, die ausschließlich auf 'männlichen' Wirtsbakterien des Stammes Escherichia coli K12 wachsen und RNA als Erbsubstanz enthalten. Diese Phagen gaben den Forschern nun auch eine leicht isolierbare mRNA in die Hand. Sie bildete die Grundlage für die intensive Erforschung der RNA-Reduplikation und der Translation der Proteine.

Das Spektrum der inzwischen entdeckten RNA-Viren reicht von den kleinen RNA-Bakteriophagen, zu denen auch der hier untersuchte Phage M 12 gehört, über das ihm sehr ähnliche Polio-Virus bis hin zu den tierischen Sarkom- und Leukämieviren. Neuerdings gelang es der Gruppe von SPIEGELMAN in New York, Spuren dieser Viren auch in bösartigen Neubildungen beim Menschen zu entdecken.

Durch diese Nähe des Bakterien-Phagen-Systems zu pathogenen und onkogenen Viren erhält die molekularbiologische Forschung an diesen Objekten als Modellsystem zusehens aktuelles medizinisches Interesse. An diesem Modellsystem wurden Methoden wie etwa Hybridisierung von Nukleinsäuren, Sedimentationsanalyse und selektive radioaktive Markierung erarbeitet. Sie waren die Voraussetzung für die mittlerweile erfolgreichen Arbeiten an Viren höherer biologischer Systeme.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verstehen sich zunächst im Zusammenhang des Bakterien-Phagen-Modellsystems. Es geht dabei um die mechanistische und strukturelle Aufklärung eines Sonderfalls bei der Vervielfältigung von Erbmaterial: Um die Vermehrung viraler RNA ohne DNA-Zwischenstufen. Nach unseren bisherigen Kenntnissen, die im 'zentralen Dogma der Molekularbiologie' von CRICK als 'DNA makes RNA makes protein' umschrieben wurden, kommt die direkte Vervielfältigung der RNA im normalen Leben der Zelle nicht vor. Die RNA-Viren

müssen in ihrem Wirt also einen Syntheseparat auf -
bauen, der ihm ansich fremd ist. Solche Sonderfälle ha-
ben für die biologische Forschung einen ähnlichen heu-
ristischen Wert wie etwa ein pathologischer Befund für
die Physiologie.

Möglicherweise haben jedoch diese virusinduzierten Fähig-
keiten der Zelle auch unter Normalbedingungen eine Funk-
tion [gehabt]. So ließe sich etwa die Entstehung der am-
plifizierten Gene im Säugetiergenom, die Bildung bestimm-
ter repetitiver Sequenzen im Erbgut besser erklären, wenn
man eine RNA-abhängige RNA- oder DNA-Synthese als Zwischen-
Mechanismen annehmen würde. Ähnliches gilt auch für be-
stimmte Funktionen des Kurzzeitgedächtnisses oder für den
Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Für die experimentelle Medizin genchirurgischer Richtung
könnte ebenfalls der Einsatz virusinduzierter RNA-Repli-
kassen von Wert sein, wenn es darum geht, etwa eine iso-
lierte RNA zu vervielfältigen.

Im Folgenden soll nun kurz der untersuchte kleine RNA -
Bakteriophage vorgestellt und eine Einführung in die Pro-
blematik der Replikation seiner RNA gegeben werden.

B. Spezielle Einführung

1. Systematik und Morphologie des Phagen M 12

Die Virus-Systematik ist noch im Fluß. Jährlich er-
scheint eine revidierte Einteilung der bekannten Vi-
ren bei MELNICK im 'Progress of Medical Virology.' .
Nach der bei BONIN 1973 zitierten Aufteilung erscheint
der von uns untersuchte Bakteriophage M 12 [isoliert
und beschrieben von HOFSCHNEIDER 1963] in der Gruppe
der Picornaviren (pico-RNA-V.). Diese Viren besitzen
ein kubisches Kapsid mit einem Durchmesser von nur
18 bis 30 Nanometer. Alle weiteren Virushüllen fehlen.
Außer Bakteriophagen gehören dieser Gruppe noch die
Rhinoviren, die Enzephalomyokarditis-Viren und einige

Säugetier- und Humanviren unbekannter Pathogenität an (ECHO, ECBO, ECMO usw.).

Die kleinen RNA-Phagen wiederum gehören fast alle zur f2-Gruppe. Sie umfaßt eine Reihe serologisch, morphologisch und funktionell nahezu identischer Bakterien-Viren: f2, MS2, R 17, μ 2 und M 12 [für die Identität vgl. etwa ENGER und KAESBERG 1965 für R 17 und M 12 Hüllprotein]. Ein einzelner Phage ist von dieser Gruppe serologisch unterschieden, der Phage Q_{β} . Die von diesem Phagen kodierte Proteine, z.B. die RNA-Replikase, sind stabiler als die Proteine der f2-Gruppe und eignen sich besser für in vitro-Experimente. In allen anderen Eigenschaften gleicht dieser Phagen jedoch den Viren der f2-Gruppe.

Das Kapsid der Picornaviren hat eine ikosaedrische Symmetrie und einen Durchmesser von 20 Nanometer (bei den Phagen). Das Kapsid ist aus zwei viruskodierten Proteinen aufgebaut: 180 Einheiten des Hüllproteins (Molekulargewicht [MG] $14 \cdot 10^3$) und einer Einheit des A-Proteins (MG $4,2 \cdot 10^4$), das auch Reifungs- oder Anheftungsprotein genannt wird. Die im Virusteilchen verpackte RNA besitzt ein MG von $1,1 \cdot 10^6$. Sie kodiert neben den beiden Bausteinen des Kapsids noch für einen Baustein der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Replikase).

2. Biologie des Phagen M 12

Man kann ein Virus als ein verpacktes vagabundierendes Gen verstehen. Um realisiert und vervielfältigt zu werden bedarf es einer geeigneten Wirtszelle. Für die Bakteriophagen sind dies Bakterienzellen. Die kleinen RNA-Phagen sind dabei auf Bakterien des Stammes Escherichia coli K 12 angewiesen, die sämtlich einen Fertilitätsfaktor besitzen ('männliche' Bakterien). Treffen sie durch die Molekularbewegung eines flüssigen Mediums oder andere äußere Kräfte mit solchen Bakterien zusammen, so heft-

ten sie sich mittels einer spezifischen Erkennungsregion an einen F-Pilus des Bakteriums an. Für die Phagen spielt bei diesem Vorgang offensichtlich das im Kapsid enthaltene A-Protein eine Rolle.

Die Anheftung des Phagen an den Pilus ist energieunabhängig (kommt nur durch physikalische Kräfte zustande). Das als nächster Schritt folgende Eindringen des Virusgenoms in die Zelle ist dagegen energieabhängig [VALENTINE und WEDEL 1965, PARANCHYNOCH u.a. 1970]. Ob neben der RNA auch Virusproteine mit in die Zelle gelangen müssen, um die Infektion zu ermöglichen, ist noch nicht geklärt. Es sprechen jedoch einige Ergebnisse der jüngsten Zeit dafür, daß das A-Protein an die RNA gebunden mit in die Bakterienzelle gelangt. LEIPOLD und HOFSCHEIDER 1974 fanden heraus, daß ein Komplex aus Virus-RNA und A-Protein intakte Bakterien infizieren kann, wozu reine RNA nicht in der Lage ist.

Nach der Infektion dient die Virus-RNA zunächst als Messenger für die Synthese der Virusproteine, wobei eine Reihe von Regelmechanismen für die charakteristischen Produktionsraten der einzelnen Viruskomponenten und des viruskodierten Bausteins der Replikase sorgen [Einzelheiten bei EGGEN und NATHANS 1969, WARD u.a. 1970 und LODISH 1970 und 1971]. Auch in homologen sowie heterologen in vitro-Systemen ließ sich die Phagen-RNA in- zwischen translatieren [heterologe S.: SCHREYER u.a. 1973, homologe S.: KONINGS u.a. 1970]. Die Reihenfolge der Ablesung der Gene auf der RNA ist von 5' nach 3': Replikaseuntereinheit, Hüllprotein und A-Protein [KONINGS u.a. 1970].

Sobald die viruskodierte Untereinheit der Replikase gebildet ist, tritt sie mit zwei Translationsfaktoren, den Elongationsfaktoren T_4 und T_5 , und einem Translationskontrollfaktor (i) aus der Wirtszelle zur reifen Replikase zusammen [KONDO u.a. 1970, TRAVERS u.a. 1970, HA Y-WARD u.a. 1971, KAMEN u.a. 1972 und BLONIENTHAL u.a. 1972]. Der Faktor i kontrolliert dabei den Aufbau des Enzyms

autokatalytisch [GRONER u.a. 1972, KUO und AUGUST 1972] über die Translation der phagenspezifischen Untereinheit.

Je nach Art der im Virus enthaltenen Nukleinsäuren muß die Strategie der Infektion durch Viren einen eigenen Charakter haben. BALTIMORE führte in einem zusammenfassenden Artikel 'Expression of Animal Virus Genomes' 1971 sechs verschiedene Wege an, auf denen Viren die Synthesemaschinerie der Wirtszelle an sich reißen. Weitere Arbeiten über den derzeitigen Stand der experimentellen Ergebnisse sind: WEISSMANN und OCHOA 1967, HOFSCHEIDER und HAUSEN 1968, ERIKSON 1968 sowie AUGUST 1969. Mehr auf einzelne Strukturen des Replikationsgeschehens der viralen Nukleinsäuren gehen speziell für die RNA-Phagen BISHOP und LEVINTOW 1971, HINDLEY 1973 sowie WEISSMANN u.a. 1973 ein.

Über den Zusammenbau und die Ausschleusung der fertigen Viren ist noch wenig bekannt. Man weiß nur, daß der Viruszusammenbau offenbar über eine Folge spezifischer Komplexe abläuft und daß die Ausschleusung auch ohne komplette Lyse des Wirts möglich ist.

3. Die Replikation der Phagen-RNA

a) Einführung in die Fragestellung

Für die Herstellung neuer RNA-Phagen in der infizierten Bakterienzelle ist nicht nur die Synthese der Virus-Strukturproteine notwendig, sondern auch die Vervielfältigung der viralen RNA. Beide Synthesen benutzen in gegenüberlicher Richtung die aus dem Viruspartikel eingedrungene (Plusstrang-) RNA: die Translation der RNA läuft vom 5'-Phosphatende zum 3'-Hydroxyende, die RNA-Synthese in der Gegenrichtung [AUGUST u.a. 1968 und SPIEGELMAN u.a. 1968]. Beide Enzyme konkurrieren also bei ihren Biosynthesen. Um 'Unfälle' zu vermeiden haben KOLAKOWSKI und WEISSMANN 1971 einen Mechanismus vorgeschlagen, nach dem es die Replikase schafft, die Replikation einer RNA während deren Translation zu beginnen. Die Replikase hef-

tet dazu an zwei Stellen ihres Vorlagestranges an und 'schaltet' dadurch die Translation 'ab'. Einzelheiten werden später besprochen (siehe Abb. 13).

Als man die kleinen RNA-Phagen fand, stellte sich sofort die Frage nach dem Mechanismus, mit welchem die Synthese der Nachkommen-RNA vorgenommen wird. Eine der RNA-Ver-mehrung vergleichbare Aufgabe ist der Zelle -nach unseren Kenntnissen- normalerweise nicht gestellt. Über -haupt wird im Normalfall doppelsträngige Nukleinsäure (in der Regel DNA) als Erbmaterial benutzt.

Eine Nukleinsäure, die aus zwei komplementären Strängen besteht, besitzt als 'Archivmaterial' große Vorzüge. Sie ist mechanisch stabiler als ein Einzelstrang und ver-fügt informatorisch über eine große Redundanz. Wenn ein Strang beschädigt wird, läßt sich eine Reparatur nach Vorlage des Gegenstranges leicht bewerkstelligen. Für den Molekularbiologen ist wichtig, daß bei allen bislang untersuchten Organismen die Vervielfältigung der Nukleinsäuren nach dem Mechanismus des 'complementary base reading' vorgenommen wird: Nach der Information, die in der Sequenz eines Vorlagestranges ('template') steckt, wird antiparallel das Negativ produziert, nach dem dann wird die Ausgangssequenz wieder hergestellt. Der Negativstrang bleibt dabei zweckmäßiger Weise gleich mit der Vorlage verbunden.

Es ist uns nicht bekannt, welche Selektionsbedingungen zur Entstehung von Viren führten, die dennoch im Virion eine einzelsträngige Nukleinsäure (DNA oder RNA) enthalten. Womöglich könnte man für die RNA-Viren anführen, daß ein gewisser Selektionsvorteil darin bestehen könnte, wenn eine zur Translation fertige mRNA in die Zelle gelangt, deren Kodierung Proteine hervorbringt, die sofort nach Infektion die Biosynthese der Wirtszelle 'umschalten'.

Als man daran ging, die Replikation der Nukleinsäuren der kleinen RNA-Phagen zu erforschen, waren die ersten Daten für die Phagen, die einzelsträngige DNA enthalten, bereits bekannt [SINSHEIMER u.a. 1962 für Φ_{X174}]. Bei diesen Phagen hatte man gefunden, daß aus dem viralen

Einzelstrang zunächst ein Doppelstrang synthetisiert wird (Replikative Form = RF). Der RF ist zunächst die Vorlage für die Synthese neuer Doppelstränge (semikonservative Duplikation) und dient dann auch als template für die Herstellung neuer DNA-Einzelstränge, die in die Nachkommenviren verpackt werden. Intermediärformen, die aus dem doppelsträngigen template und wachsenden Einzelsträngen bestehen bezeichnete man als RI (Replikative Intermediate).

b) Zwischenstufen bei der RNA-Replikation

Bei der experimentellen Untersuchung der Vervielfältigung des Erbmateri als der kleinen RNA-Bakteriophagen galt die erste Suche einer DNA als Intermediärform. Man konnte sich einfach nicht vorstellen, daß nicht wenigstens während der Infektion in der Wirtszelle DNA-Formen als Zwischenträger des viralen Erbmateri als auftreten sollen (was später für die RNA-Tumoviren auch zutraf). In den infizierten Bakterien fand sich jedoch keine DNA mit phagenspezifischer Sequenz: für M 12 AMMAN u.a. 1964.

Dafür zeigten sich jedoch in den infizierten Zellen doppelsträngige RNA-Moleküle viralen Ursprungs. Sie wurden in Anlehnung an die kleinen DNA-Phagen 'RF' genannt: MONTAGNIER und SANDERS 1963 für das Enzephalomyokarditis-Virus, WEISSMANN und BORST 1963 für MS2 sowie AMMAN u.a. 1964 und FRANCKE UND HOFSCHEIDER 1966a für M 12. Ebenfalls in Analogie zu den DNA-Phagen ließ sich in den infizierten Zellen eine RI-Form identifizieren, die aus einem doppelsträngigen Gerüst und wachsenden Einzelsträngen besteht [FENWICK u.a. 1964].

AMMAN u.a. fanden 1964 heraus, daß der RF nach Aufschmelzen eine RNA freigibt, die auf Bakterien ohne Zellwand (Sphäroblasten) infektiös ist. Im Gegensatz dazu wird intakte doppelsträngige RNA von Sphäroblasten nicht akzeptiert, sie ist nicht infektiös [HEHLMANN und HOFSCHEIDER 1970]. Verwendete man zur Infektion Phagen, deren RNA ('parental') radioaktiv markiert war, so konnte

man die so gekennzeichnete RNA zunächst im RF isolieren [ERIKSON u.a. 1964]. Nach einigen Minuten erschien die Radiokativität auch in der RI-Fraktion und schließlich in einzelsträngigen RNA-Molekülen [zusammengefaßt mit Literatur bei BISHOP und LEVINTOW 1971]. Daraus wurde als Syntheseweg der RNA kleiner RNA-Phagen die Linie vom Einzelstrang zum Doppelstrang (RF) zum neuen Einzelstrang gezogen. Alle diese Ergebnisse wurden in vivo gewonnen, d.h. sie wurden nach Analyse phagenspezifischer RNA aufgestellt, die aus infizierten Bakterien isoliert wurde.

Fügt man diese in-vivo-Ergebnisse zu einem Schema zusammen, so ergibt sich das MODELL I von Abb. 1 a. Die einzelsträngige Phagen-RNA ([+] = Plusstrang) infiziert die Zelle und wird durch die Replikase zum Doppelstrang ergänzt. Dabei wird der komplementäre Strang ([-] = Minusstrang) gebildet. Bei dem ersten Syntheseschritt entstehen Intermediärformen der Replikation, die hier, bei der Synthese des negativen Stranges 'negativer RI' genannt werden. Die Terminologie ist in der Literatur uneinheitlich: WEISSMANN u.a. 1968 'first step replicating complex', SPIEGELMAN 1968 'positive (!) Franklin-structure' sowie BISHOP und LEVINTOW 'negative RI'.

Auch bei ^{der} bereits angeführten doppelsträngigen Zwischenform (RF) ist die Terminologie nicht einheitlich. SPIEGELMAN spricht nach einem ihrer Entdecker von der 'Hofschneider-structure'. Der RF dient nach MODELL I als template zur Synthese neuer Plusstränge (die Vorlage für diesen Syntheseschritt ist hier ein doppelsträngiges Molekül !). Auch bei dieser Biosynthese gibt es eine besondere RI-Form mit unfertigen Produktsträngen, die wir zum Unterschied vom 'negativen' hier 'positiver RI' nennen. [In der Literatur bei WEISSMANN 'second step RI', SPIEGELMAN 'negative Franklin-structure' und BISHOP 'positive RI'.

c) RNA-Replikation in vitro

Von allen Picornaviren kodiert der Phage Q_β für die sta-

bilste Replikase. Das Enzym konnte aus infizierten Bakterien gereinigt und zur In vitro Replikation von Φ_{β} - RNA eingesetzt werden. Man konnte aus der Plusstrang - Fraktion die komplementären Minusstränge synthetisieren und aus diesen wiederum die infektiöse Plusstrang-RNA. Auch bei dieser RNA-Vervielfältigung im Reagenzglas lief die Synthese über die bekannten Zwischenstufen RF und RI, die man nach Reinigung (Phenolisierung) der Nukleinsäuren aus dem Reaktionsansatz isolieren konnte [SPIEGELMAN u.a. 1968].

Allmählich wurde es jedoch möglich, die Replikase in so reinen Präparationen einzusetzen, daß es nicht mehr notwendig war, die RNA vor ihrer Charakterisierung zu 'reinigen', d.h. von den Proteinen (Nukleasen) zu trennen. Die Analyse der RNA-Produkte und der bei der Replikation auftretenden Zwischenstufen brachte nun Ergebnisse, die an der Gültigkeit von MODELL I (Abb. 1 a) Zweifel aufkommen ließen. Im RNA-Synthesegemisch war plötzlich auch ein freier Minusstrang zu finden, die Zwischenformen verfügten über weitgehend einzelsträngige Bereiche, die im Test empfindlich gegen Inkubation mit pankreatischer RNAase (RNAase I aus E.coli) sind [FEIX u.a. 1967, WEISSMANN u.a. 1968].

Unterzog man jedoch diese RNA wieder einer Behandlung mit Phenol (wie vorher zur Reinigung), fanden sich die typischen doppelsträngigen RNA-Moleküle wieder. FEIX und WEISSMANN schlossen aus dieser Beobachtung, daß die doppelsträngige RNA nichts als ein Isolationsartefakt sei und forderten ein neues Modell der RNA-Replikation (MODELL II Abb. 1 b). Nach diesem Modell wird der Plusstrang an einem freien Minusstrang synthetisiert, die Produktstränge bleiben nicht mit dem template verbunden.

d) Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Es war zunächst nicht möglich, zu entscheiden, welches der beiden Modelle der RNA-Vervielfältigung tatsächlich mit den Vorgängen in der infizierten Zelle übereinstimmt. Die Analyse der in vivo ablaufenden Vorgänge blieb auf

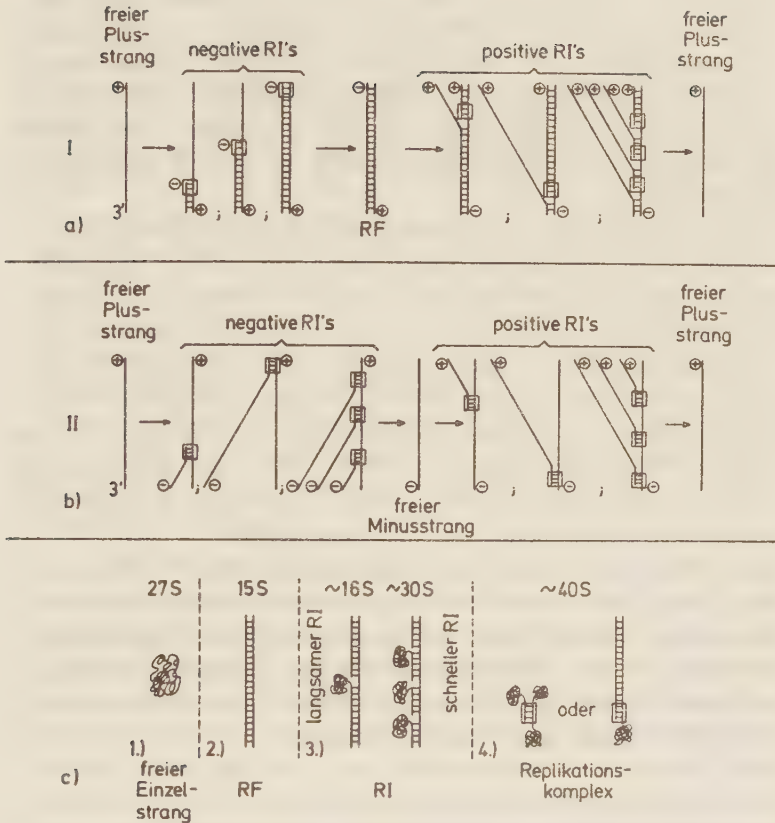


Abb. 1 Modell der Replikation (a) nach den Befunden an gereinigter RNA aus infizierten Zellen, (b) nach in-vitro-Daten. Die unteren Figuren stellen eine Synopse der wichtigsten Zwischenformen und ihrer Sedimentationswerte dar (c).

die Phenolisierung der RNA angewiesen, weil die Wirtsbakterien Nukleasen enthielten, die im Extrakt der geöffneten Bakterien die RNA zerstört hätten, bevor sie zu analysieren sind. Dabei handelt es sich um die RNAase I, die einzelsträngige RNA degradiert und RNAase III, die doppelsträngige RNA abbaut.

Aus dieser Schwierigkeit half erst der Versuch, eine geeignete nuklease-freie Mutante der Wirtsbakterien zu gewinnen. KINDLER u.a. beschrieben 1973 eine dertige Mutante vom Stamm E. coli K 12, deren Zellextrakt weniger als ein Prozent der RNAase-Aktivitäten an RNAase I und RNAase III bezogen auf den Wildtyp enthält [KEIL und HOFSCHNEIDER 1972].

Dieser mutierte Bakterienstamm sollte die methodische Voraussetzung für diese Arbeit sein. Es sollte versucht werden, den Bakteriophagen in ihm zu vermehren und dann die virusspezifischen Replikations-Zwischenstufen direkt in Extrakt der infizierten Bakterien zu analysieren. Dadurch sollte entschieden werden, nach welchem der beiden in Abb. 1a und 1b vorgestellten Modelle die Replikation der kleinen RNA-Bakteriophagen abläuft: ist eine doppelsträngige, basengepaarte RNA (RF) eine notwendige Zwischenstufe bei der Replikation der RNA oder nicht?

Zu diesem Zweck wurde die replizierende RNA für kurze Zeit (Puls-) markiert und noch im Bakterienextrakt verschiedenen Enzymen ausgesetzt, deren Einwirkungsmöglichkeit auf die RNA einen Schluß auf das Ausmaß der Basenpaarungen zuläßt. Die Übersicht über die einzelnen Experimente bringt das nächste Kapitel.

II. Übersicht der nachfolgenden experimentellen Arbeit

Bevor es möglich war, die Replikation des kleinen RNA-Phagen M 12 in der Bakterienmutante E. coli K 12 AB 301-105 zu studieren, waren Vorversuche notwendig. Sie sollten klären, wie die Wachstums- und Wirtseigenschaften des Stammes sind, ob seine Nukleasefreiheit ausreicht und ob er für das Antibiotikum Rifampizin sensitiv ist, in

dessen Gegenwart selektiv die Synthese der wirtsspezifischen mRNA und rRNA/tRNA abgeschaltet werden soll.

In einer Reihe weiterer Vorexperimente sollte der Verlauf der Replikation des Phagen M 12 in der neuen Mutante kontrolliert werden. Vor allem sollte ermittelt werden, ob die Phagen-RNA in einem Ausmaß synthetisiert wird, das mit den Werten übereinstimmt, die bei den üblichen Wirts-Stämmen erzielt wurden.

Nach diesen Vorversuchen wurde dann untersucht, welche Eigenschaften die Intermediärformen bei der RNA-Replikation besitzen, bevor sie durch Einwirkung von Phenol oder Detergentien zur 'Reinigung' verändert werden können. Dazu wurden die infizierten Zellen kurz vor dem Öffnen durch radioaktive RNA-Vorstufen für einige Sekunden oder Minuten markiert. Die radioaktiven Isotope gelangen dabei in die gerade frisch synthetisierte RNA und können in dieser untersucht werden: Ist der radioaktiv gekennzeichnete Abschnitt empfindlich gegen RNAase III, so sind die Replikationskomplexe nahe dem Syntheseort doppelsträngig, sind sie empfindlich gegen RNAase A aus Rinderpankreas (pankr. RNAase), so findet sich die Markierung in einem einzelsträngigen Abschnitt.

In anschließenden Experimenten sollte die Beziehung der Strukturen, die im Rohextrakt infizierter Bakterien gefunden wurden, zu den bekannten Replikationsformen, die sich nach Reinigung der RNA analysieren lassen, hergestellt werden. Dazu wurde die radioaktiv markierte RNA vor und nach Reinigung (durch Phenolisierung) auf Rohrzuckergradienten nach ihrem Sedimentationsverhalten aufgetrennt und für jede der bekannten Fraktionen bestimmt, ob sie ihre Sekundärstruktur durch die Reinigungsprozedur verändert.

Ebenfalls wurde versucht, die Mechanismen bei der Synthese des Plusstranges und des Minusstranges zu differenzieren, was bislang noch nicht möglich war.

Material und Methoden

1. Verwendete Materialien

Folgende im Handel erhältliche Enzyme wurden verwendet: Lysozym aus Eiweiß [E.C. 3.2.1.17] von Sigma St.Luis (Grad I), RNAase A aus Rinderpankreas = pankr. RNAase [E.C. 2.7.7.16] von Sigma St. Luis (Type I-A), DNAase (RNAase-frei) [E.C. 3.1.4.5.] von Worthingham New Jersey (DPFF 1 AA), Polynukleotidphosphorylase [E.C. 2.7.7.8.] aus *Micrococcus luteus* von Boehringer Mannheim. Das Sarkosyl wurde als Reinsubstanz von der Firma Geigy überlassen, das Rifampizin als Reinsubstanz von Grünenthal. Alle verwendeten Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad, der Rohrzucker für die Gradientenanalyse war frei von RNAase (Schwarz-Mann). Alle Ansätze wurden mit demineralisiertem Wasser bzw. bei Enzymtests mit Aqua bidest gemacht.

Mit folgenden Radioisotopen wurde experimentiert: ^{32}P als trägerfreies Orthophosphat [5 mCi/ml], ^3H als tritiiertes Urazil ($6\text{-}^3\text{H}$, [30 Ci/mmol]), als tritiiertes Uridindiphosphat ($5'\text{-}^3\text{H}$, Ammoniumsalz, [3 Ci/mmol]) jeweils von Buchler-Amersham und als tritiierte Polyuridylsäure (Kaliumsalz, [23,6 mCi/mmol polym.Phosphat]) von Schwarz-Mann. ^{14}C als $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Urazil [mehr als 50 Ci/mol] von Buchler-Amersham.

2. Phagen und Bakterien

Der RNA-Phage M 12 und alle DNA-Bakteriophagen sind Laborstämme, der RNA-Phage ϕ_3 stammt von CH. REISSMANN. Als Bakterienstämme dienten bei Phagenexperimenten: Escherichia coli K 12 AB 301 RNAase $_{19}^-$ (F^+ , λ^+ , met^- und RNAase I $^-$) von GESTELAND [1966], E.coli K 12 AB 301-105 (F^+ , λ^+ , RNAase I $^-$, RNAase III $^-$) aus dem eigenen Labor [KINDLER u.a. 1973] und E.coli C 1415 (F^- , rha^- , his^- , rep^-) für den Test auf lysogene Lambda-Phagen [CALENDAR u.a. 1970].

Die RNAase III für die Enzym-Inkubationen der replikativen RNA wurde aus einer Mutante gewonnen, die spontan RNAaseI $^-$ ist [CAMPAK und WADE].

3. Puffer und Bakterienmedien

Die meisten Präparationen und die Inkubationen mit RNAase aus Rinderpankreas erfolgten in SSC-Puffer [0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat mit etwa neutralem pH]. Für die Inkubationen mit RNAase III wurde R-Puffer nach ROBERTSON u.a. 1968 eingesetzt [0,1 M NH_4Cl , 0,01 M Mg-Azetat, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6)]. Für die Präparation von RNAase III wurden zwei weitere Puffer verwendet: TM I [0,03 M NH_4Cl , 1 mM EDTA, 0,01 M Mg-Azetat, 6 mM β -Mercaptoäthanol, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,8)] und TM II mit zusätzlich 0,2 M NH_4Cl . Die Präparation von reiner doppelsträngiger RNA (RF) verlangte folgenden Puffer: 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) = STE-Puffer.

Bei der Bakterienzucht wurde als Vollmedium das Difco-Medium 'M-3' eingesetzt. Meist jedoch kam das ärmere CW-Medium zur Verwendung: pro Liter 60 g casamino-acids von Difco ('technical'), 20 g Glyzerin, 1 g Hefeextrakt Difco, 0,3 mmol MgSO_4 und NaOH bis zum pH 7,5. Ein noch mehr reduziertes Medium ('CW/2') enthielt nur die Hälfte Aminosäure-Extrakt.

4. Bestimmung der Phagenzahl [Plaquetest]

Das bakteriophagenhaltige Material wird in Phosphatpuffer [0,7 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 % KH_2PO_4 , 0,4 % NaCl] schrittweise verdünnt. Jeweils 0,1 ml jeder Verdünnung werden zusammen mit etwa 0,3 ml einer Übernachtskultur eines sensitiven Bakterienstammes auf eine sterile Petrischale gegeben, mit fünf Millilitern eines auf 45°C erwärmten Weichagars [CW-Medium ohne Phosphat mit 1 % Difco-Bactoagar] vermischt. Bei der nachfolgenden Inkubation bei 37°C verfestigt sich der Agar. Die Bakterien bilden einen trüben Rasen. Jedes infektiöse, biologisch aktive Virusteilchen bildet im Rasen ein klares 'Loch' (Plaque). Die Zahl der Löcher wird auf den Milliliter Material umgerechnet und als 'pfu' (Plaque-forming-unit) angegeben.

In normalen Phagensuspensionen sind nur etwa 10 % der enthaltenen Viren biologisch aktiv ('physikalische Phagen'). Sie werden bei der Wellenlänge von 260 nm gemessen.

5. Bestimmung des Bakterientiters

Bakteriensuspensionen werden in Phosphatpuffer [Zusammensetzung in Abschnitt -4- der Methoden] verdünnt. Von jedem Verdünnungsschritt werden 0,1 ml auf eine Bodenagarplatte verteilt. Der Bodenagar enthält im Liter 10 g Pepton (Difco) und 15 g Agar (Difco). Er wird nach der Sterilisation mit 4 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Die Platten werden mit je 15 ml heißem Bodenagar gegossen und nach Erstarren für 15 min ultraviolett bestrahlt. Nach Inkubation bei 37°C wird die Zahl der Bakterienkolonien, die auf den Platten gewachsen sind, ausgezählt. Mit etwas größerem Fehler läßt sich die Bakterienzahl auch in einer Zählkammer nach HELBER bestimmen. Hierbei wird die Zahl der Bakterien unter dem Phasenkontrastmikroskop im kleinsten Quadrat gezählt und für den Titer pro Milliliter mit dem Faktor $2 \cdot 10^7$ multipliziert. - Die Möglichkeit, die Bakterienzahl nach der optischen Dichte der Bakteriensuspension zu ermitteln, wurde nicht angewendet.

6. Messung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Methode von LOWRY u.a. 1951 bestimmt. Rinderserumalbumin diente als Vergleichssubstanz für die Festlegung der Eichkurve.

7. Ermittlung des DNA-Anteils von Nukleinsäurepräparationen

In dieser Arbeit wird häufig RNA radioaktiv markiert. Um festzustellen, wieviel der zugefügten radioaktiven Nukleinsäurevorstufen in DNA statt in RNA eingebaut wurde, nutzt man die Tatsache aus, daß DNA einer alkalischen Lösung gegenüber widerstandsfähiger als RNA ist. Daher wurde nach JACOB u.a. 1970 von jeder RNA-Präparation ein Aliquot für 60 min bei 45°C in 0,3 N KOH inkubiert. Unter diesen Umständen bleibt die DNA stabil, die RNA läßt sich jedoch nicht mehr in 5 % TCA fällen (vgl. Sektion -23- dieser Methoden). Routinemäßig wird der so ermittelte DNA-Anteil der radioaktiven Markierung von der Gesamtradioaktivität abgezogen. Er war in keinem Fall größer als 5 % der Gesamtmarkierung.

8. Nachweis lysogener Phagen in einer Bakterienkultur

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde der durch Mutagenisierung neu gewonnene Bakterienstamm E. coli K 12 AB 301-105 (siehe Methoden Sekt. -2-) als Wirt für die Phagensynthese verwendet. Es sollte geklärt werden, ob die Zellen wie der Ausgangsstamm AB 301 einen lysogenen Lambda-Phagen enthalten.

Dazu werden die Bakterien über Nacht in Luria Broth (Difco [BERTANI 1951]) gezogen und die Bakterien aus der Kultur durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird mit Chloroform [10 Vol.-%] versetzt und auf Lambda auf dem sensitiven Stamm C 1415 getestet, wo diese Phagen klare Plaques bilden. Einzelheiten der Methode sind bei CA - LENDAR u.a. 1970 zu finden.

9. Gewinnung und Anreicherung von RNA-Phagen

Es wird eine Übernachtskultur E. coli K 12 AB 301 vom Schrägagar in M-3-Medium angesetzt. Von der Übernachtskultur wird zunächst eine Probe für einen Test auf Reinheit und Sensitivität für die Phagen durchgeführt. Dazu wird wie beim Plaque-Test (Sekt. -4-) ein Tropfen der Übernachtskultur ausgespätet und ein Tropfen Phagensuspension darauf gegeben. Dieser Tropfen muß auf dem sonst geschlossenen Bakterienrasen einen klaren Plaque geben, wenn die Kultur ohne Phagenkontamination und sensitiv sein soll. Daraufhin wird die Übernachtskultur 1:200 in M-3-Medium verdünnt. Der Normalansatz hat ein Volumen von 10 l. Bei 37°C wird die Kultur über einen Belüftungsstein mit Preßluft versorgt.

Bei einer Bakteriendichte von $2-3 \cdot 10^8/\text{ml}$ [Zählkammer] werden die Phagen mit einer m.o.i. von zehn dazugegeben. Es wird für weitere zwei bis drei Stunden belüftet. Tritt die Lyse der Bakterien nicht spontan ein, werden etwa ein Vol.-% Chloroform dazugegeben und für weitere 15 min belüftet. Kleinere Kulturen werden zur Lyse mit 10 Vol.-% einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,3) mit 10 mg/ml Lysozym (frisch gelöst) sowie einigen Tropfen Chloroform versetzt.

Nicht lysierte Bakterien und größere Bakterientrümmen werden daraufhin niedertourig für 20 min abzentrifugiert. Die Temperatur sollte von diesem Zeitpunkt 4 °C nicht übersteigen. Der Überstand dieser Zentrifugation wird mit Kochsalz bis auf eine Konzentration von einem halben Mol pro Liter versetzt und nach dem Zwei-Phasen-System nach PHILIPSON u.a. 1960 weiterbehandelt: Unter Rühren werden 8 Gew.-% Polyethylenglykoll-6000 (zerstoßen) hinzugegeben und die Lösung über Nacht stehen gelassen. Die Phagen lassen sich daraufhin niedertourig sedimentieren. Es finden sich etwa 90 % der eingesetzten Phagen im Sediment.

10. Anreicherung radioaktiv markierter RNA-Phagen

Will man die Bakteriophagen radioaktiv markieren, muß man das Verfahren des vorhergehenden Abschnitts (-9-) etwa modifizieren. Die Bakterien werden in phosphat - freiem CW-Medium (für ^{32}P) oder phosphatfreiem $\text{C}/2$ - Medium (für ^3H -Urazil) gezogen und nur mit einem m.o.i. von 0,1 infiziert. Die radioaktive Markierung wird fünf Minuten nach Infektion in einer Konzentration zwischen 0,1 und 1,0 mCi/ml hinzugefügt. Die Kultur wird für 5-7 Stunden weiterinkubiert. Die besten Ergebnisse erzielt man, wenn man für die Kultur einen Schüttelkolben mit einem etwa zehnfach zu großen Fassungsvermögen verwendet, der bei etwa 200 Bewegungen in der Minute kreisförmig geschüttelt wird.

Nach der Anreicherung in Zwei-Phasen-System nach PHILIPSON u.a. 1960 (Sekt. -9-) werden die radioaktiv markierten Phagen immer (die unmarkierten Phagen nur für hochkonzentrierte Stockungen) zweimal über CsCl -Stufengradienten konzentriert (Methode modifiziert nach DELIUS 1966]. Dazu werden in ein Nitrozellulose-Röhrchen für den SW-27 Rotor der Spinco-Ultrazentrifuge folgende CsCl -Lösungen mit einer dicken Kanüle unterschichtet: 1 ml [1,2 g/ml], 1 ml [1,3 g/ml], 2 ml [1,35 g/ml], 2 ml [1,4 g/ml], 2,5 ml [1,5 g/ml] und 3,5 ml [1,7 g/ml]. Über diesen Stufengradient können zwei Milliliter phagenhaltiges Material überschichtet werden. Es wird bei

10°C für 28 Stunden bei 23000 U/min zentrifugiert und die Flüssigkeit von unten in Fraktionen zu 0,4 ml gezapft. Während der Zentrifugation bildet sich aus den vorgeformten Konzentrationsstufen des Salzes ein kontinuierter Gradient aus, in dem sich die Phagen bei einer Dichte von 1,45 bis 1,46 [g/ml] als sichtbare Bande anordnen. Nach jedem Gradienten werden die phagenhaltigen Fraktionen (Plaquetest oder Radioaktivitätsprofil !) gegen SSC-Puffer dialysiert.

11. Infektion mit radioaktiv markierten Phagen

Eine bis zur Zelldichte von $2-3 \cdot 10^8$ logarithmisch gewachsene Zellkultur sensitiver Bakterien wird mit einer m.o.i. von 10 bis 100 infiziert. Nach zehn Minuten Infektionsmöglichkeit kann die weiterlaufende Nachinfektion durch Phagen im Medium durch Wechsel desselben gestoppt werden. Dazu werden die Bakterien niedertourig abzentrifugiert.

Soll der Weg der infizierenden radioaktiven RNA während der Replikation verfolgt werden, muß man auch die an den F-Pili angehefteten, jedoch nicht penetrierten Phagen entfernen. Dies geschieht am besten vor dem Wechsel des Mediums durch Behandlung mit einem Ultraturrax für eine Minute. Dabei werden die Pili quantitativ entfernt, wie eigene Kontrollen bei 4°C zeigen. Bei dieser Temperatur heften Phagen zwar an die Pili an, können jedoch nicht in die Bakterien eindringen. Man kann nach dem Abscheren durch den Ultraturrax die radioaktiven Phagen komplett nach niedertouriger Zentrifugation im Medium wiederfinden [Fehler geringer als ein Prozent].

12. Präparation infektiöser Phagen-RNA (Plusstrang)

Zur Präparation der Phagen-RNA werden gereinigte Phagen (CsCl-Gradient, Sekt. -10-) einer Phenolextraktion nach SCHUSTER u.a. [1956] unterzogen. Die Phagensuspension wird bei 37°C für 15 min in Gegenwart von 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) inkubiert und anschließend mit dem gleichen Volumen in entsprechendem Puffer äqui-

libriertem neutralem Phenol für fünf Minuten bei Zimmertemperatur ausgeschüttelt. Die beiden flüssigen Phasen werden durch fünf Minuten niedertour. Zentrifugation getrennt. Diese Prozedur wird mit gleichen Volumina Phenol bzw. Puffer wiederholt. Zwischenphasen bleiben bei der wässr. Phase und werden mit Phenol extrahiert.

Die gesammelten wässr. Phasen werden mit dem doppelten Volumen absolutem Alkohol bei -20°C für mindestens vier Stunden gefällt. Die RNA läßt sich dann bei 12000 U/min abzentrifugieren und in Puffer aufnehmen. Zur Kontrolle der Reinheit und Intaktheit schichtet man ein Aliquot auf einen linearen Rohrzuckergradienten (SSC-Puffer mit 1 % SDS), wie er im Abschnitt -21- der Methoden beschrieben ist. Die RNA sedimentiert als geschlossener Gipfel bei 27 S (siehe Abb. 2 auf der folgenden Seite).

Im Alkohol gefällt ist die RNA bei -20°C praktisch unbegrenzt haltbar. Man kann kleine Aliquots jedoch auch in Puffer (mit 0,1% SDS) eingefroren aufbewahren.

Will man phenolextrahierte RNA gleich weiterverarbeiten, so kann man die Phenolreste mit absolutem Äther ausschütteln. Die Ätherreste beseitigt man durch Ausblasen in der Kälte.

13. Präparation von RNAase III

Es wird eine nach ROBERTSON u.a. 1968 modifizierte Methode angewendet: E. coli MRE 6000 oder K12-AB 301 werden bis zu einer Dichte von etwa $3 \cdot 10^8$ Zellen/ml gezogen, abzentrifugiert und bei tiefen Temperaturen von mindestens -20°C rasch eingefroren.

Danach wird der sog. S-30-Extrakt nach WEBSTER u.a. 1967 hergestellt. Er besteht aus jener Fraktion eines Zellextraktes, der nach Zentrifugation bei 30-tausendfacher Erdbeschleunigung [30000 xg] im Überstand bleibt. Es werden je fünf g Zellpaste gefroren bei 4°C in einem gekühlten sterilen Mörser durch Reiben mit 6,25 g Aluminiumoxid bis zu einer 'Kaugummi'-Viskosität verarbeitet.

Dann werden 100 µg RNAase-freie DNAase dazugegeben und der Zellextrakt mit 10 ml TM-Puffer in ein Zentrifugen-

röhrchen transferiert. Anschließend wird für 20 Minuten bei 30000 Xg zentrifugiert. Der Überstand wird bis zur zweiten Ammonsulfatfällung nach der Vorschrift von ROBERTSON u.a. 1968 weiter aufgearbeitet. Man erhält so eine RNAase III - Präparation mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 1000 Einheiten/mg Protein [nach ROBERTSON], die sich bei -100 °C lagern lassen.

14. Präparation von doppelsträngiger RNA (^3H M 12-RF und ^3H pU⁺pA)

a) Doppelsträngige M 12 RNA (RF)

Zur Präparation von doppelsträngiger Phagen-RNA wird eine Methode von FRANKLIN [1966] mit leichten Veränderungen angewendet: 0,2 Liter einer log. wachsenden Bakterienkultur AB 301 in phosphatfreiem CW-Medium werden bei einer Zell -

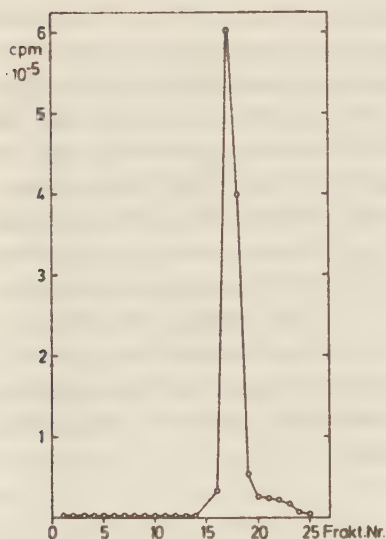


Abb. 2 Linearer Rohruckergradient mit radioaktiv markierter M 12 RNA. Für Details siehe Meth. Sekt. -21- .

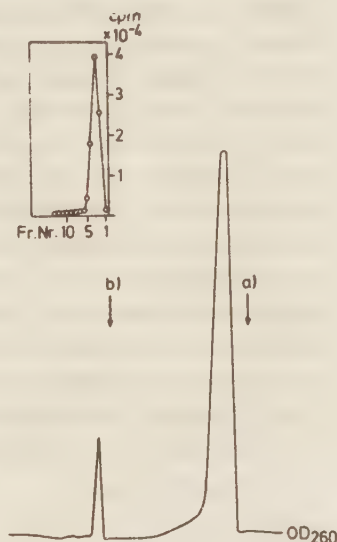


Abb. 3 Elutionsprofil radioaktiv markierter M 12 RF-RNA von einer Whatman CF-11-Säule. Erklärung s. Text.

dichte von $1,8 \cdot 10^8$ im Milliliter mit Bakteriophagen (m.o.i. = 10) infiziert. Fünf Minuten nach Infektion wird Rifampizin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt [Rifampizin wird in Äthanol gelöst und dann bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml mit Aqua bid. verdünnt; diese Stammlösung hält sich etwa vier Wochen bei 4 °C]. Nach einer weiteren Minute wird tritiiertes Urazil (5 mCi) hinzugefügt. Vierzig Minuten nach Infektion, zum Zeitpunkt der größten Ausbeute an RF, wird die Kultur rasch abgekühlt, zweimal in SSC-Puffer gewaschen und phenolisiert, wie im Abschnitt -12- beschrieben.

Nach der Äthanol-fällung werden die Nukleinsäuren in 1 ml SSC-Puffer [1 M NaCl] aufgenommen und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Nach dieser Behandlung fallen alle Nukleinsäuren, die größere einzelsträngige Abschnitte besitzen aus und lassen sich abzentrifugieren [10000 X g]. Der Überstand wird gegen STE-Puffer dialysiert und mit Äthanol bis zu einer Konzentration von 15 Vol.-% versetzt. Diese Lösung wird über eine mit STE-Puffer [15 % EtOH] äquilibrierte Whatman CF-11-Säule chromatografiert. Die DNA wird mit STE-Puffer [15 Vol.-% EtOH] eluiert: a) in Abb. 3 (die Kurve gibt die Nukleinsäurekonzentration im Eluat wieder, die der Monitor bei 260 nm Wellenlänge aufzeichnet). Der RF kommt mit reinem STE-Puffer von der Säule (b)). Parallel wird von allen Fraktionen ein Aliquot entnommen und die Radioaktivität gemessen (für den RF-Gipfel siehe Inset Abb.3). - Man erhält besonders reinen RF, wenn man die Salzfällung zweimal durchführt und die Chromatografie auf einer kleineren Säule wiederholt. Weitere Einzelheiten über die Isolation des M 12-RF bei FRANCKE u. HOFSCHEIDER 1969.

b) ^3H polyU* · poly A

Zur Präparation von synthetischer doppelsträngiger RNA werden die beiden Homopolymere (z.B. Polyadenylsäure und Polyuridylsäure) in einer Hybridisierungsreaktion bei hohen Ionenkonzentrationen [2,5 X SSC] verbunden. Die Polymerisationsreaktion verläuft bei äquivalenten Konzen-

trationen beider Partner so stürmisch, daß bei 5 bis 8 mg/ml "ausgangskonz. die Präparation zunächst gallertig verfestigt wird.

Soll die doppelsträngige RNA radioaktiv markiert sein, kann man nach MATTHAI 1967 das pU aus tritiiertem Uridin-5'-Diphosphat herstellen. Man benutzt für diese Reaktion das Enzym Polynukleotidphosphorylase [in Ggw. von Mg^{++} und Guanylyl-(3'→5')-Uridin = GpU läuft folgende Reaktion: $GpU + n \cdot UDP \xrightarrow{PNPase} GpU(U)_n + (P_i)_n$. Die Vorschrift von MATTHAI wurde wie folgt modifiziert: Das Reaktionsgemisch besteht aus 350 µl 1 M Tris (pH 8,8), 25 µl 1 M $MgCl_2$, 25 µl 40 mM EDTA (pH 7,0), 50 µl Rinderserumalbumin [5 mg/ml], 750 µl UDP [0,16 M, (pH 8,0)], 470 µl 3H UDP $\cong$ 300 µCi, 100 µl GpU (= 2 mg) und 730 µl A.bidest. Die Reaktion wird eingeleitet durch Zugabe von 500 µl PNPase = 1,15 mg in das auf 35°C vorgewärmte Reaktionsgemisch. Nach einer Stunde wird die Reaktion durch Ausschütteln mit Phenol (destilliert, neutral, in SSC äquilibriert) beendet. Die Kontrolle der Reaktion ist durch Papierchromatographie möglich, wie bei MATTHAI beschrieben.

15. Selektive radioaktive Markierung intrazellulärer Phagen - RNA

Zehn Milliliter phosphatfreies CW-Medium werden mit einer frischen Übernachtskultur E.coli 1 : 200 inokuliert. Die Kultur wird bei 37°C belüftet, bis der Bakterientiter auf $2 \cdot 10^8$ /ml angewachsen ist. Die Kultur wird daraufhin mit einer m.o.i. von 10 [biolog. Titer] infiziert und weiterbelüftet. Die Effizienz der Infektion wird an einem Aliquot getestet [0,1 ml], das vier Minuten p.i. entnommen und tausendfach in Medium verdünnt wird. Nach einer Stunde sollte diese Kontrolle einen Phagentiter haben, der etwa ein Zehntel der ursprünglichen Bakteriendichte ausmacht (bei einer Wurfgröße von 100).

Fünf Minuten p.i. wird Rifampizin [siehe Meth. Sektion -14 a-] bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml hinzugefügt. Dadurch hemmt man die Synthese wirtsspezifischer RNA. Die phagenspezifische RNA wird nun entweder 32 min p.i. für 20 sek. mit 100 µCi 3H -Uracil/ml (puls-)markiert

oder zwischen 17 min p.i. und 32 min p.i. mit 10 $\mu\text{Ci/ml}$ (langzeit-) markiert. Man stoppt die Markierung, indem man die Kultur auf das gleiche Volumen einer eiskalten Stopp-Lösung gießt [Natriumazid 5 mM mit 2,5 mg/ml Urazil]. Zur besseren Effizienz kann die Stopplösung noch mit zer-schlagenem Eis gemischt sein.

16. Bereitung eines Rohextraktes aus Bakterien

Bei der Herstellung eines Bakterienextraktes folgen wir der Methode von BORST und WEISSMANN 1965, bei der die Zellbestandteile nicht mit Detergentien zusammen gebracht werden. Die Bakterien werden zunächst aus dem Kulturmedium abzentrifugiert und zweimal in SSC-Puffer gewaschen. Dann werden sie hundertfach in SSC-Puffer konzentriert und jeweils ein Milliliter dieser Suspension mit ca. ein Gramm Glasperlen [$\varnothing$ 18 μm] in 0,5 ml SSC-Puffer vermischt. Bei der gesamten Aufarbeitung sollte die Temperatur unter 4 $^{\circ}\text{C}$ liegen.

Die Bakteriensuspension wird mit den Glasperlen zusammen bei einer Frequenz von 5000 Bewegungen in der Minute für 10 min geschüttelt. Die dabei entstehende Wärme wird über einen auf -20 $^{\circ}\text{C}$ vorgekühlten Aluminiumblock, in den das Röhrchen mit den Zellen eingespannt wird, abgeleitet. Durch diese Prozedur werden die Wände der Bakterien zerstört, während die Zellorganellen weitgehend geschont werden.

Der Zellextrakt wird von Zelltrümmern und Glasperlen bei 10000 X g abgetrennt und in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff [-190 $^{\circ}\text{C}$] gelagert. In unserer Terminologie bezeichnen wir den Zellextrakt auch 'Rohextrakt' (im Unterschied zu den 'gereinigten Nukleinsäuren' nach Phenol-extraktion).

17. Herstellung der 'gereinigten Nukleinsäure-Fraktion'

Man reinigt Nukleinsäuren gewöhnlich durch Ausschütteln mit Phenol (Sekt. -12-). Bei dieser Prozedur arbeitet man bei Zimmertemperatur. Ebenfalls ist zur Lyse der Bak-

terien gewöhnlich eine Vorbehandlung in 1 % SDS bei 37 °C erforderlich (bei tiefen Temperaturen fällt das SDS aus). Um schonender bei 4 °C arbeiten zu können, modifizierten wir die Methode der Nukleinsäureextraktion folgendermaßen: Die konzentrierte Baktereinsuspension (Sekt. -16-) wird bei 4 °C mit 0,4 % Sarkosyl [nicht-ionisches Detergenz] für 15 min inkubiert und dann mit neutralem Phenol, das in der Kälte mit SSC-Puffer äquilibriert wurde, dreimal ausgeschüttelt. Nach der Phenolisation wird entweder ausgeäthert (Sekt. -12-) oder in EtOH gefällt. Die ausgeätherten Aliquots sind bei -190 °C über Monate lagerbar. Wir nennen die so erhaltenen Präparationen 'RNA nach Phenol', 'Nukleinsäurefraktion' oder 'gereinigte RNA'.

18. Untersuchung des Nuklease-Gehalts von Zellextrakten

a) Gehalt an RNAase I

Für die Strukturuntersuchungen an replikativer RNA in dieser Arbeit war es nötig, den RNAase I - Gehalt der verwendeten Wirtszellen genau zu bestimmen. Dazu wurde der Testansatz nach SPAHR 1966 verwendet. Der Ansatz enthält in einem Milliliter SSC-Puffer 7,5 µg ^{32}P -M 12 -RNA [entsprechend 2500 c.p.m.], die zu 98 % sensitiv für RNAase I ist. Der Zellextrakt enthält bis zu 0,3 mg/ml Protein.

Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wird der Test durch Zugabe desselben Volumens TCA [10 %ig] beendet. Unter diesen Bedingungen degradiert eine Einheit RNAase I [SPHR] ein Mikrogramm M 12 RNA zur Löslichkeit in 5 % TCA. Die Menge der ausgefällten RNA wird durch Filtration des Ansatzes durch Nitrozellulosefilter mit 65 µm Porendurchmesser bestimmt (siehe Sekt. -23-).

b) Gehalt an RNAase III

Die doppelstrangspezifische RNAase III wird in Zellextrakten nach einer modifizierten Methode von ROBERTSON u.a. 1968 quantitativ bestimmt: In 0,2 ml enthält der Testansatz 0,02 mg $\text{pU}^{\bullet}\text{-pA}$ [$^{\bullet}\text{ }^3\text{H}$] (spez. Akt. 0,3 Ci/mol polymeres Phosphat) in R-Puffer. Die synthetische RNA ist zu 75 % sensitiv gegen RNAase III. Der Zellextrakt enthält

maximal 280 µg Protein im Milliliter. Nach 15 min Inkubation bei 35 °C wird der Test wie unter a) beschrieben gestoppt und ausgewertet. Eine Einheit RNAase III degradiert 1 µmol polymeres Phosphat bis zur Löslichkeit in 5 % TCA [nach ROBERTSON].

19. Funktionstest der DNA-abh. RNA-Polymerase

Der Einsatz von Rifampizin erfordert zur Kontrolle einen Test, mit dem das 'Abschalten' der RNA-Polymerase [E.C. 2.7.7.6.] festgestellt werden kann. Wir folgen im wesentlichen den Angaben von ZILLIG u.a. 1966. Allerdings verwendeten wir als Template für das Enzym ¹⁴C GTP, da das gebräuchliche ATP oder UTP ebenfalls von der RNA-geprägten Polynukleotidphosphorylase [SCHÄFER u.a. 1972] angenommen wird.

20. Strukturbestimmung von RNA durch Behandlung mit RNAase aus Rinderpankreas und RNAase III

a) RNAase aus Rinderpankreas

Die RNAase, die sich aus Rinderpankreas isolieren läßt, degradiert spezifisch einzelsträngige RNA. Will man den Anteil doppelsträngiger, also basengepaarter Regionen in einer bestimmten RNA-Struktur ermitteln, läßt man durch die pankr. RNAase die einzelsträngigen Anteile degradieren und bestimmt dann durch Fällung in 5 % TCA (Sekt. -23-) den doppelsträngigen Rest.

Dieser Test wurde folgendermaßen ausgeführt: In einem Milliliter SSC-Puffer wird die Probe von max. 30 µg RNA mit 50 µg pankr. RNAase bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die zugefügte RNAase vermag mehr als 50 mg RNA zu zerstören, ist also etwa tausendfach im Überschuß. Der doppelsträngige Anteil der untersuchten Probe wird nach dem Test in Prozent (pankr.-) RNAase-resistentes Material angegeben. Die Prozentzahl ist auf ein zur Kontrolle ohne Nukleasebehandlung sofort gefälltes Aliquot bezogen.

b) RNAase III aus Escherichia coli

RNAase III besitzt im Vergleich zur pankr. RNAase eine konträre Spezifität: Sie degradiert doppelsträngige RNA .

Nach Inkubation mit diesem Enzym läßt sich also die einzelsträngige RNA als Rest nach TCA-Fällung quantitativ bestimmen. Die zusätzliche Inkubation der RNA-Proben mit RNAase III dient also zur internen Kontrolle bei wichtigen Experimenten.

Der RNAase III Inkubationsansatz hat folgende Zusammensetzung: In 200 µl R-Puffer wird die RNA [max. 30 µg] mit 100 Einheiten RNAase III für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Testansatz wird analog wie unter a) beschrieben weiterbehandelt.

21. Auftrennung radioaktiv markierter RNA nach ihrer Sedimentationseigenschaft im linearen Rohrzuckergradienten

Zur differenzierten Analyse von Nukleinsäuren bietet sich eine Auftrennung der verschiedenen Spezies nach ihrem Sedimentationsverhalten an. Diese Technik wird bei linearen Gradienten auch Bandsedimentation genannt. Sie vermag verschiedene Partikeln nach ihrer Masse und ihrer Raumstruktur aufzutrennen. Starre Moleküle, wie die doppelsträngige RF-RNA sedimentieren deutlich langsamer als aufgeknäulte einzelsträngige RNA-Moleküle (vgl. Abb. 1 c) im Rohrzuckergradienten, obwohl sie die doppelte Masse besitzen.

Die Gradienten wurden aus Rohrzuckerlösungen dreier verschiedener Konzentrationen in SSC-Puffer gemischt. Auf den Boden des Zentrifugenröhrchen gibt man 500 µl als 'Kissen'. Darüber wird aus einem Mischgefäß ein linearer Gradient zwischen 20 % und 5 % Saccharose geschichtet. Das Kissen besteht aus 60 %iger Rohrzuckerlösung. Die fertigen Gradienten lassen sich mit 150 bis 200 µl RNA-Lösung überschichten.

In einem SW-50 Rotor der Spinco-Ultrazentrifuge laufen die Gradienten für die jeweils angegebene Zeit bei 4°C und 45000 Umdrehungen in der Minute. Nach dem Lauf werden die Röhrchen von unten her mit einer 12'er Kanüle durchstoßen und Fraktionen zu 2 oder 4 Tropfen entnommen. Diese werden je nach experimenteller Anordnung in Röhrchen mit 1 ml 5 % TCA, 1 ml SSC-Puffer mit 50 µg

pankr. RNAase oder 4 ml 5mM EDTA getropft, wie bei den einzelnen Versuchen angegeben ist.

Die Sedimentationswerte der einzelnen Gipfel fraktionen werden durch Marker bestimmt, deren Sedimentationsverhalten [S-Wert] in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt worden ist. Es wurde einzelsträngige RNA aus radioaktiv markierten M 12-Phagen [27 S] oder intakte Phagen [74 S] verwendet.

22. Hybridisierung von RNA

Die Hybridisierung von Nukleinsäuren wurde zuerst von HALL und WEISSMANN 1961 für RNA-DNA-Hybridisation beschrieben. Unsere Methode stellt eine Kombination der Methoden von WEISSMANN 1964 (hoher Ionengehalt bei 120 Grad Celsius zum Aufschmelzen und Renaturieren bei 60°C) und HEHLMANN und HOFSCHEIDER 1970 (niedriger Ionengehalt bei 100°C zum Aufschmelzen der RNA) dar. Die RNA wird in 5mM EDTA soweit verdünnt, daß alle im SSC-Puffer des Standardgradienten (Sekt. -21) enthaltenen Ionen eine Maximalkonzentration von 3mM haben. Diese Proben werden in Schraubröhrchen für fünf Minuten in kochendes Wasser gestellt, rasch im Eisbad abgekühlt und mit konzentriertem SSC-Puffer [20 X] auf eine Endkonzentration von 2,5 X SSC gebracht. Vor dem Verdünnen wird den Proben ein mind. hundertfacher Überschuß an unmarkierter einzelsträngiger (Plusstrang-)Phagen-RNA hinzugefügt.

Die Proben werden daraufhin für sechs Tage bei 60 °C inkubiert, abgekühlt und in je vier Aliquots aufgeteilt. Zwei Aliquots werden mit demselben Volumen 10%ige TCA gefällt, die beiden anderen Aliquots werden für 15 min in 50 µg/ml pankr. RNAase [1 X SSC] bei 37°C inkubiert und daraufhin auch in 5%iger TCA gefällt. Die RNAase-Resistenz errechnet sich in Prozent der sofort gefällten Kontrollen.

23. Bestimmung der Radioaktivität

Es wurden zwei verschiedene Methoden der Radioaktivitäts-

bestimmung verwendet. Entweder wurde die Gesamtaktivität einer Probe bestimmt. Dazu wurde das Material auf ein Whatman 3MM-Papierfilter aufgetragen und nach Trocknen im Scintillationszähler gemessen.

Meistens wurde jedoch nur die in 5 %iger TCA fällbare Radioaktivität gemessen (RNA-Bruchstücke, die kleiner als Oligonukleotide sind, bleiben säurelöslich). Dabei wird das Material durch einen Sartorius-Membranfilter mit der Porengröße von 60 mμ gegeben. Zuvor wird zur besseren Fällung bei kleinen Aliquots 100 μg Hefe-RNA dazugegeben. Die Membranfilter werden nach Aufbringen der Probe mit 30 ml eiskalter 5%iger TCA gewaschen und mit 2-3 ml dest. Wasser nachgespült. Nach dem Trocknen (Papierfilter unter der Infrarotlampe, Membranfilter für 20 min bei 100 °C) werden die Filter in Röhrchen mit Toluol-Szintillationsflüssigkeit gebracht, die auf einen Liter Toluol 3,6 g PPO [2,5-Diphenyloxazol] und 450 μg POPOP [Dimethyl-POPOP = 1,4-bis-2-(Methyl-5-Phenoxazolyl)-Benzol] enthält. Die Radioaktivität wird in einem Flüssigkeits-Szentillationszähler der Firma Packard bestimmt, der eine Messung von Dreifachmarkierung erlaubt.

Die Zählung auf Papierfiltern hat den Vorteil der größeren Schnelligkeit, es werden jedoch Isotope von geringer Strahlungsintensität wie Tritium leicht durch das Papier abgeschirmt.

Experimenteller Teil

I. Vorversuche

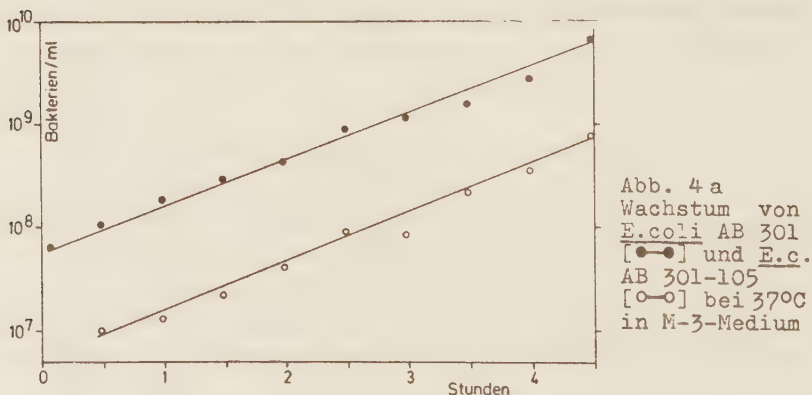
A. Beschreibung der E.coli Mutante AB 301-105

1. Fragestellung

Für die Untersuchung der replikativen Intermediärformen in Rohextrakten der infizierten Bakterien ist die Verwendung einer möglichst ribonukleasefreien Wirtszelle Voraussetzung. Daher wurde in den hier beschriebenen Experimenten auf einen RNAase I - und RNAase III - freien Bakterienstamm zurückgegriffen, den Dr. Kindler in diesem Labor isoliert hat [KINDLER u.a. 1973]. Die Wachstums- und Wirtseigenschaften dieses Stammes waren zu Beginn dieser Experimente noch unbekannt. Es war also nötig, die künftigen Wirtszellen soweit zu charakterisieren, daß die erwarteten Resultate für die Replikation des Phagen M 12 aussagekräftig werden.

2. Wachstum in verschiedenen Medien bei 37 °C

Bei den Experimenten zur Charakterisierung der Mutante AB 301-105 wurden die Vergleichswerte vom parentalen Stamm AB 301 gewonnen, der seit Jahren



als Wirtszelle für den Phagen M 12 in diesem Labor eingeführt ist [FRANCKE und HOTSCHNEIDER 1969]. Beide untersuchten Stämme wachsen nicht auf Minimalmedium, da

schon der parentale Stamm eine unbekannte Auxotrophie besitzt [GESTELAND 1966]. Wie Tabelle 1 zeigt, ließ sich

Tabelle 1 Charakterisierung des Stammes *E. coli* AB 301 [RNAase I] im Vergleich zur Mutante *E. coli* AB 301-105

	AB 301	AB 301-105	dieser genetische Defekt nicht durch Zugabe einzelner Aminosäuren zum Minimalmedium substituierten. Offensichtlich benötigt der Stamm AB 301-105 weitere Wachstumsfaktoren: Obgleich beide Stämme mit der gleichen Generationszeit von 40 min in Vollmedium wachsen (Abb. 4 a), so benötigt der Stamm 301-105 doch im ärmeren
Vermehrungseffizienz für die Phagen:			
M 12	1,0	0,95	
Q ₈	1,0	0,94	
M 13	1,0	0,73	
T 3	1,0	-,--	
T 4	1,0	3,80	
T 5	1,0	0,49	
T 6	1,0	-,--	
Wachstum in Minimalmedium ohne Zusatz	--	--	
mit Aminos.	--	--	
Generationszeit in M-3 Medium	40 min	40 min	
in CW/2 Medium	30 min	90 min	
Lysogenität für Lambda	+	+	

CW/2-Medium eine dreifach längere Generationszeit als der

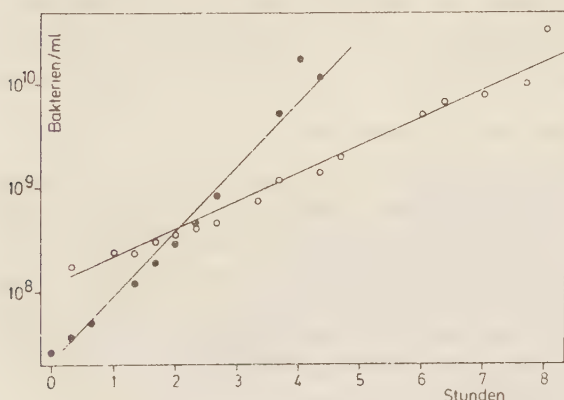


Abb. 4 b
Wachstum von
E. coli AB 301
[●●●] und *E. coli*
AB 301-105
[○●○] bei 37°C
in CW/2 Medium

parentale Stamm AB 301. Offenbar besitzt das M-3-Medium diese für das Wachstum wichtigen Faktoren.

3. Vermehrung von RNA- und DNA-Phagen

Wie die Tabelle 1 zeigt, vermehrt die Wirtsmutante AB 301-105 die beiden RNA-Phagen M 12 und Q_β nahezu mit der gleichen Effizienz wie der parentale Stamm. Im Gegensatz dazu zeigten die DNA-Phagen kein einheitliches Bild. Für den Phagen T₄ war die Vermehrungseffizienz deutlich vergrößert, für T₅ und M13 war sie erniedrigt und die Phagen T₃ und T₆ werden vom Stamm AB 301-105 nicht vermehrt.

Beide verglichenen Bakterienstämme sind in ihren Wirtseigenschaften für Phagen also nicht isogen. Da jedoch die Phagen M12 und M13 vermehrt werden, muß der Bakterienstamm den F-Faktor besitzen (F⁺, F' oder Hfr), weil diese Phagen nur in derartigen Wirtsbakterien infizieren können. Weiterhin ist die Vermehrung der unterschiedlichsten Coli-Phagen ein klares Argument dafür, daß wirklich ein E. coli-Stamm vorliegt: Die isolierte Mutante ist tatsächlich ein Stamm von Escherichia coli und nicht eine Kontamination.

Eine weitere Eigenheit des parentalen Stammes wurde für die neue RNAase III -freie Mutante nachgeprüft, die Lambda-Lysogenität. Im Test nach CALENDAR 1970 fanden sich im Medium einer Übernachtskultur AB 301-105 $5,2 \cdot 10^3$ pfu/ml Lambdaphagen, was für lysogene Stämme normal ist. Auch diese Übereinstimmung der beiden Stämme spricht dafür, daß AB 301-105 wirklich ein Derivat des Stammes AB 301 ist.

4. Gehalt von RNAase I und RNAase III im Zellextrakt

Die im gegebenen Zusammenhang wichtigste Eigenschaft des Stammes AB 301, von dem die hier untersuchte Mutante isoliert wurde, ist seine RNAase I -Defizienz [GESTELAND 1966]. Es war deshalb notwendig, festzustellen, ob diese Eigenschaft auch der Tochterstamm AB 301-105 bewahrt hat. Es wurde daher parallel für beide Stämme die Aktivität dieses Enzyms in den Zellextrakten bestimmt.

Dabei wurden verschiedene Verdünnungen des S-30-Extraktes (vgl. S. 32) beider Stämme nach SPAER 1966 mit je 7,5 µg

^{32}P markierter einzelsträngiger M 12 RNA inkubiert und die Abnahme an säurefällbarem Material bestimmt. Die Extrakte beider Stämme enthielten nur $5,7$ bis $5,9 \cdot 10^{-3}$ Einheiten RNAase I /mg Protein, was einem RNAase I- Gehalt von $0,1 \%$ bezogen auf Wildtyp-Zellen entspricht: siehe Tabelle 1 und SPAHR 1966.

Die RNAase III-Aktivität wurde ebenfalls parallel in den Zellextrakten der Stämme AB 301 und AB 301-105 bestimmt. Dabei fand sich in der Mutante AB 301-105 eine Enzymaktivität von $0,46$ Einheiten [ROBERTSON] /mg Protein, im parental Stamm AB 301 eine Aktivität von $50,4$ Einheiten. Dieser Wert von etwa $0,9 \%$ der parental Enzymaktivität fand sich

Tabelle 2 Ribonukleaseaktivitäten der *E. coli* Stämme AB 301 und 301-105

	AB 301	AB 301-105
RNAase I im Rohextrakt [Einh./mg]	0,0075	0,00575
RNAase III im Rohextrakt [Einh./mg]	50,4000	0,46000
RNAase III nach vier Reinigungsschritten	1060,0000	32,30000
RNAase III im Rohextrakt bei 28 °C	50,7	n.meßbar
35 °C	50,9	0,227
42 °C	40,3	0,910

in den Extrakten der Mutante AB 301-105 auch bei Temperaturen von 35 bzw. 42°C , während sich bei 28°C in diesem Stamm keine Enzymtätigkeit mehr nachweisen ließ. Der parentale Stamm zeigte, wie aus der nebenstehenden Tabelle hervor geht, dagegen bei dieser nied-

rigen Temperatur keine Minderung in der RNAase III -Aktivität. Die von KINDLER beobachtete Temperatursensitivität der RNAase III-armen Bakterien beruht also nicht auf der Temperaturempfindlichkeit des Enzyms RNAase III, das eher bei tieferen Temperaturen, also erwartungsgemäß, eine geringere Aktivität hat.

Es wurde ebenfalls der Frage nachgegangen, ob die geringe RNAase III-Tätigkeit im Rohextrakt dieser Zellen auf die Gegenwart eines Inhibitors zurückzuführen ist. Dazu wurde versucht, durch eine Enzymaufreinigung nach ROBERTSON

[1968] eine möglicherweise zwar vorhandene, jedoch unterdrückte Enzymaktivität durch Abtrennen von dem (hypothetischen) Inhibitor aufzudecken. Nach den ersten vier Reinigungsschritten (siehe S. 32/33) fanden sich zwar im Extrakt der Mutante AB 301-105 32,3 Enzymeinheiten RNAase III pro Milligramm Protein, dieser Wert stellte jedoch nur 3,0 % der durch parallele Reinigung aus der Präparation AB 301 gewonnenen Aktivität dar, wie aus dem Vergleich in Tabelle 2 auf S. 45 hervorgeht.

Man kann also schließen, daß sich wenigstens mit den gebräuchlichen Methoden kein RNAase III- Inhibitor im Extrakt aus der Mutante AB 301-105 entdecken läßt und der RNAase III-Mangel durch einen genetischen Defekt im Gen für das Enzym selbst bedingt sein dürfte.

Wie Experimente von DUNN und STUDIER 1973 und NIKOLAEV u. a. 1973 verdeutlichen, enthält auch *in vivo* die von uns verwendete Mutante nur eine minimale RNAase III-Aktivität. Daher sind die hier referierten niedrigen Enzymwerte als gesichert anzusehen und somit eine entscheidende Vorbedingung für das Arbeiten mit RNA im Zellextrakt gegeben. Wie HEHLMANN und HOFSCHNEIDER 1970 fanden, wird die RNAase III

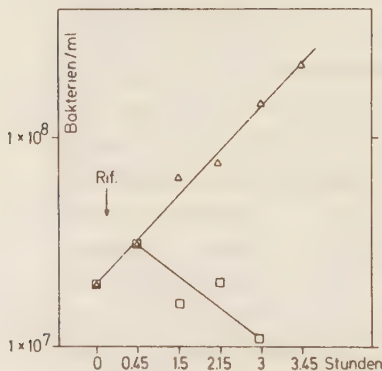


Abb. 5 Wachstumsprofil einer Kultur AB 301-105. Die Kultur wurde bei $t=0$ geteilt und bei der Marke mit $50 \mu\text{g/ml}$ Rifampizin versetzt. $\square$ - $\square$ =mit Rifampizin $\triangle$ - $\triangle$ =ohne Rifampizin.

für solche Versuche besonders störend nach dem Öffnen der Zellen tätig, da durch diese Prozedur das offenbar *in vivo* an die Ribosomen gebundene Enzym frei wird.

5. Sensitivität für das Antibiotikum Rifampizin

Für eine erfolgreiche Untersuchung der Struktur der Repli-

kationsformen bei der Vermehrung der Phagen-RNA in der infizierten Bakterienzelle ist es entscheidend, daß man dieser viralen RNA ein Kennzeichen gibt, das sie von allen anderen in der Zelle vorhandenen RNA-Spezies abhebt. Von der DNA kann man die neusynthetisierte RNA nämlich leicht dadurch differenzieren, daß man für die Markierung eine radioaktive Vorstufe verwendet, die ausschließlich in die RNA eingebaut wird: radioaktives Urazil.

Bei der Differenzierung der verschiedenen Ribonukleinsäuren macht man sich den Umstand zunutze, daß in Gegenwart des Antibiotikums Rifampizin alle jene RNA-Sorten nicht mehr hergestellt werden, die von der zellulären DNA kodiert werden (z.B. mRNA, rRNA, tRNA usw.), während nach den vorliegenden Befunden die virale RNA noch synthetisiert wird. Das Antibiotikum blockiert nämlich nach HEIL u.a. 1970 speziell die β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase.

Speziell für den als Wirtszellen in Aussicht genommenen Bakterienstamm E.coli AB 301-105 war dieser Zusammenhang jedoch noch nicht gezeigt worden: die Rifampizinsensitivität seiner Polymerase mußte erst noch gezeigt werden. In Abbildung fünf ist ein entsprechendes Experiment ausgewertet. Die Zeichnung bringt in halblogarithmischer Darstellung das Wachstum einer Kultur von Bakterien des

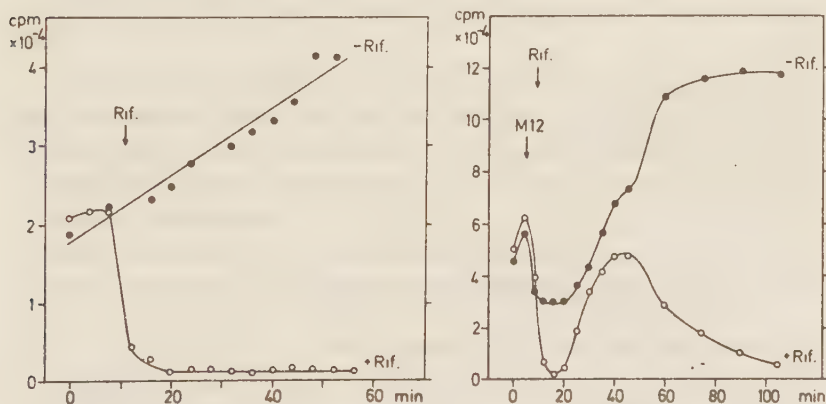


Abb. 6 Einbau von tritiiertem Urazil in a)[links] unin-fizierte, b)[rechts] mit M12 Bakteriophagen infi-zierte Bakterien E.coli K 12 AB 301-105. Eingetra-gen ist die säurefällbare Radioaktivität, die wäh-rend zwei Minuten eingebaut wird.

Stammes AB 301-105, die dreißig Minuten nach Beobachtungsbeginn geteilt wurde. Die eine Hälfte der Kultur wurde mit 50 µg/ml Rifampizin versetzt. Wie die Grafik zeigt, wachsen die Bakterien dieses Stammes in Gegenwart des Antibiotikums nicht weiter, sind also sensitiv.

Dies Resultat ließ sich durch Experimente weiter spezifizieren, bei denen gemessen wurde, wieviel radioaktiv markiertes Urazil in säurefällbare RNA während jeweils zwei Minuten zu verschiedenen Zeiten nach Infektion bzw. Rifampizin eingebaut wird. Die Abb. 6 macht deutlich, daß uninfizierte Zellen nach Rifampizin die RNA-Synthese abschalten (links). Die infizierten Zellen (rechts) schalten zunächst auch die RNA-Synthese ab, was mit der Virusinfektion zu tun haben kann. Dieser 'Schaltknick' wird jedoch erst deutlich bis zum Nullniveau durchgezogen, wenn gleichzeitig auch Rifampizin in der Kultur ist (offene Kreise). Wichtig ist aber, daß diese infizierten Zellen unter Rifampizin nach etwa 15 Minuten wieder damit beginnen, RNA zu synthetisieren: offenbar die virusspezifische RNA! Diese Synthese erreicht ihren Höhepunkt etwa 45 Minuten nach Infektion, um dann wieder zurückzugehen.

Dies Ergebnis zeigt, daß es möglich ist, in Gegenwart von Rifampizin selektiv in M 12 infizierten Bakterien E.coli K 12 AB 301-105 viruskodierte RNA zu markieren, während die unspezifische (DNA-abhängige) RNA-Synthese gestoppt ist.

Der Nachweis, daß das Rifampizin in der Zellkultur tatsächlich (in vivo) die RNA-Polymerase hemmt, wurde mit einem etwas modifizierten Testansatz nach ZILLIG u.a. 1966 in vitro geführt (siehe S. 38). Bakterien, die erst im in-vitro-Testansatz mit Rifampizin zusammengebracht wurden, hatten eine genauso verminderte Polymeraseaktivität wie die in vivo gehemmten Bakterien (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Test der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

	Einbau in pmol GTP	%	Extrakt infiz. Bakterien ohne Rifampizin <u>in vitro</u> R. <u>in vivo</u> Rif. Kontrolle [EDTA]	Einbau in % pmol GTP	
Extrakt un- inf. Bakter.				26573	91,00
ohne Rif.	29206	100,00		15144	51,80
<u>in vitro</u> Rifampiz.	16993	58,00		14683	50,05
				524	1,34

Für die Hemmung der Polymerase war es also unbedeutend, ob das Antibiotikum erst in vitro oder bereits in vivo gegeben wurde: Bakterienstoffwechsel oder die Barriere der Zellwand hindern Rifampizin nicht an seiner in vitro bekannten und analysierten Wirkung.

B. Kontrolle der M12-Phagensynthese in der Mutante E.coli AB 301-105

1. Fragestellung der Experimente

Die bisher besprochenen Vorversuche haben ergeben, daß der Stamm AB 301-105 für M12-Phagen dieselbe Sensitivität besitzt wie der Ausgangsstamm AB 301, daß die Rohextrakte frei von störenden RNAase I- und RNAase III-Aktivitäten sind sowie daß Rifampizin imstande ist, in vivo die von der Wirtszelle kodierte RNA-Synthese zu hemmen. Damit weist sich der von KINDLER u.a. 1973 isolierte Bakterienstamm als geeignet für die geplanten Experimente aus.

Die nächsten Experimente wurden durchgeführt, um sicherzustellen, daß unter den genannten Bedingungen tatsächlich die Phagenreplikation normal verläuft, das heißt mit den Literaturwerten bei etablierten Wirtsbakterien vergleichbar ist, sowie daß während kurzer Pulsmarkierungszeiten in den infizierten Zellen die replizierende Phagen-RNA ausreichend radioaktiv markierbar ist.

2. Eigenschaften der selektiv markierten M12 RNA

MEIER und HOFSCHEIDER [1972] fanden, daß während der ersten dreißig Minuten nach Infektion die Phagen-RNA- und -Proteinsynthese in Gegenwart von Rifampizin ein normales Verhalten zeigt.

Auch die in Abb. 6 gezeigte Einbaukurve von tritiiertem Urzyl in die M12 infizierten Bakterien AB 301-105 in Gegenwart von Rifampizin stellt einen Hinweis dafür dar, daß die Phagenreplikation während der untersuchten ersten 100 Minuten nach Infektion normal verläuft [Vergleichswerte für etablierte Bakterienstämme bei DELIUS und HOFSCHEIDER 1964]. Diese Befunde einer ungestörten Phagenreifung unter Rifampizin sollten nun durch die folgenden Experimente weiter untermauert werden.

Zuerst wurde geklärt, ob die RNA-Synthese in infizierten Bakterien in Gegenwart von Rifampizin regelmäßig, d.h. linear verläuft. Dies wurde zur Zeit der maximalen RNA-Synthese untersucht, wenn die Pulsmarkierung später vorgenommen werden soll. Gleichzeitig wurde geprüft, wie

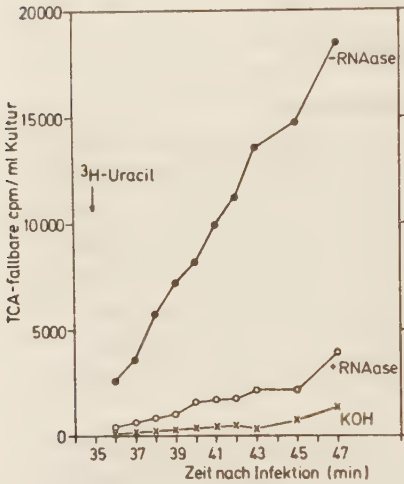


Abb. 7 Gesamtsynthese von M12-RNA in Gegenwart von Rifampizin.

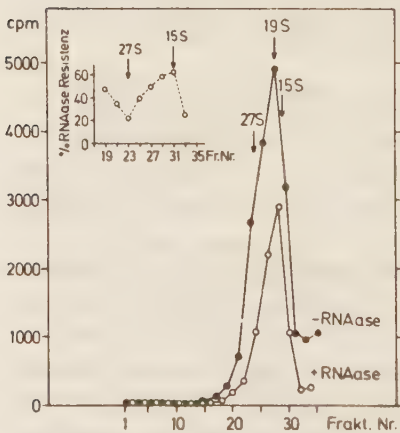


Abb. 8 Sedimentationsprofil von M12-RNA aus puls-markierten Bakterien nach Phenol

hoch die Resistenz des neu-synthetisierten Materials gegen pankr. RNAase ist und ob nennenswerte Mengen des radioaktiven Urazils in DNA eingebaut werden.

Dazu wurde eine exponentiell wachsende Bakterienkultur *E.coli* AB 301-105 mit M12-Phagen infiziert und nach fünf Minuten mit Rifampizin versetzt. Dreißig Minuten nach Infektion wird die gesamte Kultur mit 0,01 mCi ^3H -Urazil inkubiert.

Zu den auf der nebenstehenden Kurve angegebenen Zeiten werden Aliquots aus der Kultur entnommen und die bis zu dieser Zeit eingebaute RNA bestimmt (TCA-Fällung). Von Parallelproben wird die Sensitivität gegen pankr. RNAase und gegen KOH bestimmt. Wie Abb. 7 verdeutlicht, wird während der untersuchten zehn Minuten linear Urazil in säurefällbare RNA eingebaut. Etwa 20 % dieses Materials ist RNAase-resistent (offene Kreise), der DNA-Anteil beträgt etwa 6%.

Im nächsten Experiment wurde 35 Minuten nach Infektion

mit M 12 in Gegenwart von Rifampizin eine Kultur desselben Bakterienstammes für 20 Sekunden mit ^3H -Urazil pulsmarkiert. Die Kultur wurde rasch gekühlt und mit einem hohen Überschuß unmarkierten Urazils versetzt, mit Sarkosyl in der Kälte lysiert und die RNA mit Phenol in der Kälte extrahiert (siehe Methodenteil). Die so gewonnene Fraktion gereinigter Nukleinsäuren wurde für drei Stunden auf einem linearen Rohrzuckergradienten zentrifugiert und die einzelnen Fraktionen dieser Bandsedimentation alternierend mit TCA gefällt bzw. vor der Fällung mit pankr. RNAase inkubiert (gefüllte bzw. offene Kreise auf dem Diagramm Abb. 8 auf der vorhergehenden Seite). Die unter Rifampizin pulsmarkierte RNA erscheint auf dem Gradienten zwischen 12 S und 30 S, der Gipfel liegt bei 19 S. Die Haupt-RNAase-Resistenz findet sich in der Fraktion von 15 S (kleines Inset in Abb. 8).

Diese Werte stimmen gut mit den Ergebnissen von FRANCKE und HOFSCHEIDER 1966 b und 1969 überein, die bei etablierten Wirtsbakterien als Sedimentationswert für das replikative Intermediate (RI) eine Svedbergkonstante von 19 S ermittelten. Diese Werte für den Phagen M 12 stimmen auch gut mit den Literaturwerten für die anderen kleinen RNA-Bakteriophagen überein [Zusammenfassung bei BISHOP und LEVINTOW 1971].

Der Gradient in Abb. 8 zeigt auch, daß das Material geschlossen sedimentiert, die Präparationsmethode führt weder zur Degradation noch zur Aggregation der RNA-Moleküle.

Die Linearität der M12-RNA Synthese und die charakteristischen Sedimentationswerte machen evident, daß unter den für diese Arbeit gewählten Bedingungen im Wirtstamm E. coli K12 AB 301-105 die RNA-Replikation normal, d.h. mit den bisherigen Ergebnissen kongruent abläuft. Ein letztes Experiment sollte jedoch noch klären, ob die markierte RNA hauptsächlich in replizierenden Strukturen zu finden ist.

Nach den Gedankengängen von ERIKSON u.a. 1964 und anderen Gruppen [zusammengefaßt von HOFSCHEIDER und HAUSEN 1964] sollte frisch synthetisierte Virus-RNA zunächst gegen die

da sie kurz nach ihrer Synthese auf jeden Fall durch die Basenpaarung mit dem Vorlagestrang vor dem Zugriff des Enzyms geschützt sind (vgl. Abb. 1 Modell I und Modell II auf S. 23). Im Verlauf der weiteren Synthese sollte dann durch Vorrückenden des Replikationskomplexes beim folgenden (Modell I) oder beim gleichen (Modell II) Strang der Produktstrang von der Vorlage gelöst werden und somit sensitiv für die einzelstrangspezifische RNAase werden.

Tatsächlich fand sich auch bei M12 infizierten Bakterien des Stammes AB 301-105 nach einem kurzen Puls mit radioaktivem Urazil (20 sek.) die gereinigte RNA in einer zu 64% gegen pankr. RNAase resistenten Form. Gab man direkt nach dem Puls jedoch einen Überschuß an unmarkiertem Urazil in die Kultur, um den Einbau des radioaktiven Urazils abubrechen ('chase' im sog. puls-chase-Experiment), so fand sich nach weiteren vier Minuten nur noch eine Resistenz von 30%. Dies Ergebnis demonstriert in Übereinstimmung mit den Resultaten von BILLETTER u.a. 1966, SPIEGELMAN u.a. 1968 sowie FENWICK u.a. 1964, daß durch die Pulsmarkierung Material radioaktiv gekennzeichnet wird, das mindestens zu 50% beim Ende der Pulsmarkierung gerade repliziert wird (und während der 'chase'-Zeit weiterrepliziert werden kann). Im folgenden soll diese pulsmarkierte RNA daher einfach 'replikative' RNA genannt werden.

Nachdem feststand, daß unter den Arbeitsbedingungen dieser Versuche in M12-infizierten Bakterien der RNAase I- und RNAase III-freien Mutante in Gegenwart von Rifampizin replikative Phagen-RNA markiert werden kann, war es möglich, die eigentlichen Hauptexperimente in Angriff zu nehmen.

II. Hauptteil: Die Sekundärstruktur der Intermediärformen bei der Replikation des Phagen M12

A. Resistenz replikativer [pulsmarkierter] RNA gegen pankr. RNAase und RNAase III im Zellextrakt der infizierten Bakterien

1. Vorbemerkung über Pulsmarkierung von RNA

Zwei Voraussetzungen sind besonders wichtig, wenn man die Sekundärstruktur nativer Replikationsstrukturen bestimmen will: man benötigt eine Präparationsmethode, welche ohne ionische Detergentien oder Phenol auskommt und eine selektive Markierung erlaubt. Die erste Voraussetzung ist durch die Verwendung der neu isolierten Wirtszellmutante gegeben, deren Zellextrakt nur noch minimale Aktivitäten von RNAase I und III enthält. In ihrem Zellextrakt kann die RNA direkt ohne weitere Präparation untersucht werden. Die Bakterien werden dazu in der Kälte mit dem nichtionischen Detergens Sarkosyl geöffnet (siehe S. 36/37) oder mechanisch durch Schütteln mit Glasperlen zerschlagen (S. 36).

Die zweite Voraussetzung wird durch die Technik der Pulsmarkierung erfüllt, wie im vorhergehenden letzten Abschnitt der Vorversuche ausgeführt wird.

Daß die Markierungsdauer von 20 Sekunden bei den Pulsexperimenten kurz genug ist, um bei ihrem Ende die markierte RNA noch vorwiegend in den Replikationskomplexen zu finden, wird verständlich, wenn man sich die Literaturwerte über die Syntheszeit ähnlich dimensionierter Nukleinsäuren vergewärtigt: LODISH und ZINDER berechneten 1966 die Synthesedauer eines RNA-Virus-Doppelstranges mit einer Minute, KELLY und SINSHEIMER gaben 1967 die Verdopplungszeit für den Doppelstrang mit einer bis eineinhalb Minuten an. Aus Experimenten mit gereinigter Replikase des Phagen ϕ_{β} in vitro konnten dann FELIX u.a. 1968 die Synthesegeschwindigkeit bei der Synthese einzelsträngiger RNA bestimmen: Es werden 30 Nukleotide während einer Sekunde neu verknüpft, was für den ganzen RNA-Strang eine Nettosynthesedauer (ohne Initiation und Termination) von 100 Sekunden ausmacht.

Durch diese Daten wird plausibel, daß bei einer Pulsmarkierungsdauer von 20 Sekunden tatsächlich nur ein Stück der Phagen-RNA synthetisiert wird.

2. Meßergebnisse

Wird die pulsmarkierte Phagen-RNA im Rohextrakt der infizierten Wirtsbakterien E.coli AB 301-105 mit pankreat. RNAase inkubiert, so erhält man recht heterogene Ergebnisse. Die ersten Werte, die gemessen wurden, ergaben bei der pulsmarkierten RNA einen doppelsträngigen Anteil von 20 %. Es fiel auf, daß eine konsequente Einhaltung

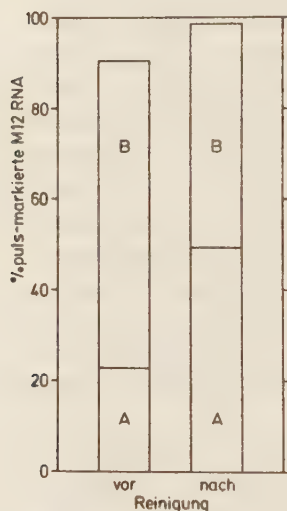


Abb. 9 a
Resistenz pulsmarkierter M12 RNA gegen [A] RNAase aus Rinderpankreas, [B] RNAase III aus E. coli.

von Temperaturen unter 4°C bei der Präparation der RNA geringere Werte für die Resistenz gegen pankr. RNAase gab. Einzelne Messungen betrugen nur 5 %, der Mittelwert von über dreißig Messungen lag bei 17 % [Extrema bei 5% und 29%].

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde dasselbe Material in einigen Experimenten mit der doppelstrangspezifischen RNAase III aus E. coli inkubiert, einem Enzym also, das gerade diejenigen Anteile der RNA angreift, die gegen die pankr. RNAase resistent sind. Es ergaben sich Werte von 68 bis 73 % RNAase III-Resistenz.

Wie in Abb. 9 a auf dieser Seite die linke Säule zeigt, sind bei den jeweiligen RNA-Präparationen

die Resistenzwerte gegen die beiden Ribonukleasen einander komplementär, die Werte ergänzen sich annähernd zu 100 %.

Setzt man die pulsmarkierte RNA beiden Ribonukleasen nacheinander aus, so wird es vollständig degradiert. Die Kontrollmessung für Degradation ohne RNAase-Zugabe ist 1 %.

3. Zwischendiskussion der Resultate

Geht man von den Meßwerten aus, die nach vorsichtigster Aufarbeitung ohne Erwärmung der Probe gewonnen wurden, so kann man mit einem Anteil von nicht mehr als 5 % basenge-

paarter Regionen in der pulsmarkierten RNA rechnen. Diese Interpretation setzt allerdings voraus, daß ein RNA-Verdau mit Ribonukleasen einen Rückschluß auf deren Sekundärstruktur erlaubt, eine Auffassung, die allgemein als unbestritten gilt.

Sie wird unter anderem dadurch belegt, daß RNA, die aus Phagen isoliert wird, inert gegen RNAase III und völlig sensitiv gegen pankr. RNAase ist und sich als einzelsträngig in der Elektronenmikroskopischen und biochemischen Analyse zeigt [vgl. ERIKSON 1968 mit Literatur, BISHOP und LEVINTOW 1972 sowie JACOBSON, pers. Mitteilung].

Ebenso spricht für die Aussagekraft der Ribonukleaseinkubationen, daß die doppelsträngige Replikative Form (RF) der RNA-Phagen [Amman u.a. 1964 b] resistent gegen die pankreatische RNAase, sensitiv gegen RNAase III ist.

Nach diesen Überlegungen müssen die Resultate dieses Kapitels also dahingehend interpretiert werden, daß die Replikation von M12 nach einem Mechanismus abläuft, der fast ausschließlich einzelsträngige Intermediärformen umfaßt (vgl. Modell II, Abb. 1).

B. Renaturierung nativer replikativer M 12-RNA durch Wärme

1. Fragestellung für die folgenden Experimente

Wie im vorhergehenden Kapitel bereits festgestellt wurde, hing die Resistenz der pulsmarkierten M12-RNA gegen pankr. RNAase weitgehend von den bei der Aufarbeitung erreichten Höchsttemperaturen ab. Nur, wenn man eine Temperatur von 4 °C als Höchstgrenze bei der Aufarbeitung peinlichst beachtet, lassen sich im Rohextrakt der infizierten Bakterien Werte von 5% RNAase-Resistenz gegen pankr. RNAase messen.

Es lag daher nahe zu untersuchen, ob sich unter kontrollierten Bedingungen nachweisen läßt, daß die replikative RNA unter Wärmeeinfluß mehr Basenpaarungen zwischen den Vorlage- und Produktsträngen ausbildet, als ursprünglich in vivo vorhanden sind.

2. Meßergebnisse

Pulsmarkierte RNA wurde im Rohextrakt infizierter E.coli AB 301-105 für verschieden lange Zeit vor der Digestion durch pankr. RNAase [in der Grafik 'RNAase I'] bzw. RNAase III in SSC-Puffer bei 37 °C vorinkubiert. Abb. 9 b und

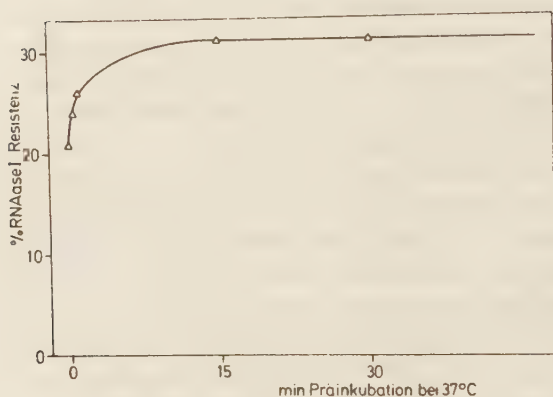


Abb. 9 b Renaturierung von pulsmarkierter M12 RNA als Veränderung der Resistenz gegen pankr. RNAase nach Inkubation bei 37 °C.

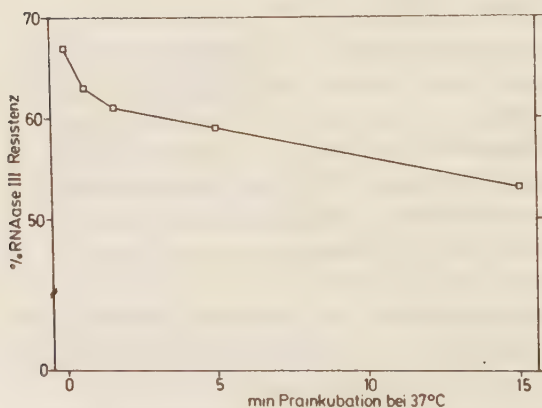


Abb. 9 c Wie vorige Abbildung, jedoch gemessen als Resistenzveränderung gegen RNAase III

c zeigen, daß sich die Resistenz gegen die beiden Enzyme in Abhängigkeit von der Präinkubationsdauer verändert: die Resistenz gegen pankr. RNAase (Abb. 9b) links auf dieser Seite) nimmt um etwa 10% zu, während die Resistenz gegen die RNAase III um den gleichen Betrag abnimmt (Abb. 9c unten auf dieser Seite).

Beide Ergebnisse bestätigen die Erwartung, daß native replikative RNA unter Temperatureinfluß zunehmend Basenpaarungen ausbildet. In beiden Experimenten beträgt die Zunahme 10 %.

3. Zwischendiskussion der Resultate

Es verwundert, daß die Renaturierung der nativen replikativen RNA im Durchschnitt nur um den zehnten Teil der Stranglänge fortschreitet, obwohl theoretisch der gesamte Replikationskomplex, soweit er während der kurzen Markierungszeit radioaktiv gekennzeichnet wurde, renaturierungsfähig sein sollte (vgl. Abb. 1).

Eine theoretisch denkbare Störungsmöglichkeit läge darin, daß zu Beginn der Renaturierung die Produktstränge noch als einzelsträngige 'Schwänze' vom Replikationskomplex abstehen [GRANBOULAN und FRANKLIN 1966]. Diese wären einer Degradation durch Restaktivitäten von RNAase I im Zellextrakt der Bakterien während der erhöhten Temperatur ausgesetzt. Dadurch könnten diese RNA-Stücke abgetrennt werden und fänden kaum noch ihren komplementären Partner. Eine derartige Degradation der replikativen RNA läßt sich leicht durch Bandsedimentation der wärmeinkubierten RNA nachweisen.

Abb. 10 auf dieser Seite unten zeigt nun einen solchen Gradienten, auf den für 15 Minuten bei 37 °C vorinkubierte RNA aus dem Rohextrakt infizierter Bakterien aufgetragen wurde. Der Hauptteil des Materials sedimentiert bei >15 S, also merklich langsamer als normale pulsmarkierte

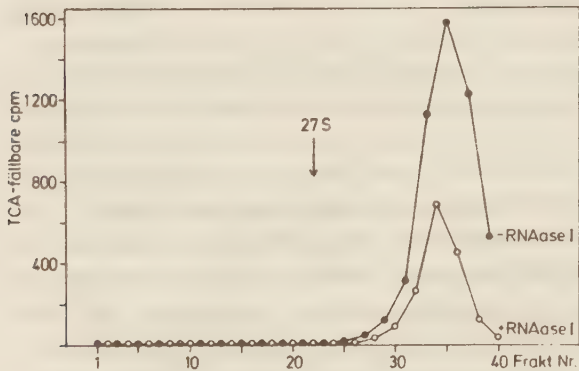


Abb. 10 Sedimentationsprofil von pulsmarkierter M12-RNA nach 15 min Präinkubation bei 37 °C. Laufzeit des Gradienten 90 min.

RNA (vgl. Abb. 8), die bei 19 S bandiert. Das Material ist also offenbar degradiert, was für den doppelsträngigen Anteil (offene Kreise) nicht zutrifft: Er sedimentiert bei 15 S.

Zur Terminologie ist noch anzumerken, daß

es logisch nicht exakt ist, hier von 'Re-Naturierung' zu sprechen und die Ausbildung von doppelsträngigen Abschnitten zu meinen. Dieser Ausdruck stammt von den DNA-Phagen, bei denen die natürliche Struktur in vivo beim RF der Doppelstrang ist. Hier ist es sinnvoll, nach Aufschmelzen der Doppelhelix von einer 'Renaturierung' zu sprechen, wenn sich der Doppelstrang wieder ausbildet.

Wir folgen jedoch trotzdem der Terminologie auch bei den RNA-Phagen, da sie sich allgemein eingebürgert hat. Allerdings muß man im Auge behalten, daß bei diesen Viren das Ausbilden von doppelsträngigen Bereichen in den Replikationskomplexen nicht die Wiederherstellung des nativen Zustands, sondern im Gegenteil dessen Änderung darstellt.

C. Renaturierung nativer replikativer M12 RNA bei der Phenolextraktion der Nukleinsäuren

1. Einführung in die folgenden Experimente

Bis zu dieser Arbeit war man zur Phenoextraktion der Nukleinsäuren gezwungen, wollte man die in vivo synthetisierte RNA der kleinen RNA-Phagen untersuchen. Dieser Eingriff war notwendig, um die nach dem Öffnen der Wirtsbakterien freiwerdende Aktivität der RNAase III möglichst schnell von der RNA abzutrennen [vgl. Einführung und HEHL-MANN und HOFSCHEIDER 1970].

Analysierte man jedoch auf diesem Wege die Sekundärstruktur der Picornavirus RNA, fand man für die Intermediärformen übereinstimmend doppelsträngige Gebilde [BISHOP und LEVINTOW 1971].

Im Gegensatz dazu hatten FEIX u.a. 1967 sowie CRAMER und SINSHEIMER 1971 gezeigt, daß Q β in vitro-RNA bzw. MS 2 - in vivo-Ribonukleinkomplexe erst durch Phenolisierung zur Ausbildung von doppelsträngiger Struktur gebracht werden.

Diese Sachlage verlangte nach Kontrollexperimenten. Vor allem war zu klären, ob die nach Phenolisierung von den anderen Autoren gefundenen doppelsträngigen Intermediärformen tatsächlich aus einzelsträngigen in vivo-Vorläufern entstehen, m.a.W. ob sich durch Phenolisierung der von uns in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen einzelsträngigen Intermediärformen eben jene Doppelstränge bilden las-

sen oder ob es sich dabei um gänzlich andere Strukturen handelt, die sich durch Reinigungsprozeduren nicht ineinander überführen lassen.

2. Meßergebnisse

Eine M12-infizierte und in Gegenwart von Rifampizin pulsmarkierte Kultur E.coli AB 301-105 wurde nach dem Waschen der Bakterien in drei Aliquots geteilt (Metho - den Sekt. 17 S.36): das erste Aliquot wird zu Zellex - trakt verarbeitet, aus dem zweiten Aliquot werden die Nukleinsäuren durch Phenolextraktion isoliert und das dritte Aliquot wird nach Bereitung des Zellextraktes zur Kontrolle phenolisiert.

Man findet im ersten Aliquot, wie bereits beschrieben, eine geringe Resistenz gegen pankr. RNAase und die Fähigkeit zur Renaturierung durch Wärme. Die beiden anderen Aliquots zeigen demgegenüber eine deutlich höhere Resistenz gegen pankr. RNAase von konstant 50% [$\pm$ 1%] und keine Renaturierungsmöglichkeit durch Wärme. Die Resistenz gegen RNAase III beträgt ebenfalls 50 % (siehe Abb. 9b, rechte Säule auf S.54).

Wie auch die native replikative RNA wird das phenolisierte Material durch aufeinanderfolgende Inkubation mit pankr. RNAase und RNAase III völlig bis zur Säure - löslichkeit degradiert.

3. Zwischendiskussion

Nach Phenolextraktion ist die replikative RNA zu einem wesentlich höheren Anteil doppelsträngig, als die vor der Reinigung untersuchte RNA.

Man könnte annehmen, daß die doppelsträngige RNA jedoch schon in der infizierten Zelle vorhanden war, bei der Präparation des Rohextrakt aber zum größten Teil verlorengeht, sodaß die geringere Doppelsträngigkeit des Materials vor der Reinigung nur vorgetäuscht wird. Dagegen spricht aber, daß sich aus dem Rohextrakt ebenfalls diese zu 50% gegen pankr. RNAase resistente RNA gewinnen läßt, wenn man das Material nachträglich noch phenolisiert (Aliquot 3).

Es ist also anzunehmen, daß die bislang nach Phenolextraktion aus infizierten Zellen gewonnenen doppelsträngigen Strukturen entweder nicht replizierende RNA darstellen [die von uns durch die Pulsmarkierung also auch nicht erfaßt wurden] oder aber Isolationsartefakte darstellen, die sich aus Formen bilden, die in vivo einzelsträngig sind.

Festzuhalten ist jedoch, daß die replikative RNA des Phagen M12 eine recht beeindruckende Fähigkeit besitzt, durch äußere Einflüsse in eine doppelsträngige Sekundärstruktur überzugehen. Von diesen Einflüssen konnten hier Phenol und Wärme dargestellt werden.

D. Sekundärstruktur der einzelnen Intermediärformen bei der M12-Replikation [RI und RF]

1. Fragestellung

Bei den folgenden Experimenten handelt es sich nicht mehr um die Aufklärung der Sekundärstruktur der replikativen M12 RNA insgesamt. Vielmehr soll nun die Morphologie der einzelnen bislang beschriebenen Intermediärformen [RI und RF] im einzelnen untersucht werden, um den Mechanismus der RNA-Replikation in vivo über diese Formen aufklären zu können.

Die nachfolgende Analyse soll zunächst zwei Fragen klären:

- 1) Wie groß sind die Anteile der beiden Intermediärformen RI und RF im ganzen der repl. RNA und
- 2) Wie hoch sind die doppelsträngigen Anteile bei diesen beiden Intermediärformen?

Als Technik zur Klärung dieser Fragen wurde die Bandseimentation gewählt (vgl. S.39).

2. Experimentelle Ergebnisse

Es wurde replikative M12-RNA aus dem Rohextrakt infizierter Zellen oder nach Reinigung durch Phenol einer Bandsedimentation auf linearen Rohrzuckergradienten unterzogen. Als Standardzentrifugationsdauer im Rotor SW 50.1 bei 45000 UpM und 40°C wurde bei den folgenden Gradienten eine Zeit von drei Stunden festgelegt. Die Gra-

Gradienten wurden nach dem Lauf in Portionen von circa 0,14 ml fraktioniert und alternierend mit pankr. RNAase inkubiert. Alle Fraktionen wurden mit 5%iger TCA säuregefällt und die gefällte RNA auf Membranfiltern gesammelt und deren Radioaktivität gezählt.

Abb. 11 unten auf dieser Seite zeigt die Radioaktivität der einzelnen Gradientenfraktionen. Die obere Kurve stellt die Aliquots dar, welche sofort mit TCA gefällt wurden (geschlossene Kreise), die untere Linie die Proben, welche vorher mit pankr. RNAase behandelt wurden. Auf den ersten Blick ist zu sehen, daß die Phenolextraktion (rechtes Profil -b-) nicht nur die Resistenz gegen pankr. RNAase deutlich ändert, sondern daß sich gleichzeitig die Sedimentationseigenschaften des Materials verändern.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit der in derartigen linearen Rohrzuckergradienten analysierten Makromoleküle wird hauptsächlich von zwei Faktoren bestimmt: von der Masse der Teilchen und ihrer Raumstruktur, ihrer 'Sperrigkeit'.

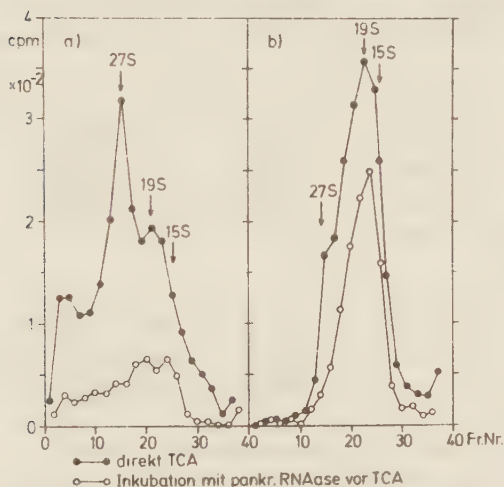


Abb. 11 Sedimentationsprofil von repl. M12-RNA, a) vor- und b) nach Phenolisierung. Einzelheiten siehe Text.

So bandiert nach FRANKE und HOFSCHEIDER 1966 betwa die einzelsträngige M12-RNA bei 27 S, während der RF mit doppelter Masse nur bei 15 S bandiert. Man erklärt dies scheinbare Paradox durch die Sperrigkeit der doppelsträngigen RNA, die sich als versteifte Doppelhelix wie ein Stäbchen durch die viskose Lösung zwin-

gen muß, während sich die einzelsträngige RNA in Abwesenheit von stabilisierenden zweiwertigen Kationen wie

eine kleine Kugel zusammengeknäult, fast doppelt so schnell sedimentieren kann (vgl. Schema in Abb. 1c). Man kann also mit einiger Annäherung sagen, daß in diesen Gradienten das Maß der 'Bremsung', welche eine Struktur erfährt, stark von deren Doppelsträngigkeit abhängt.

Insofern ist es nicht verwunderlich, wenn mit der Erhöhung der RNAase-Resistenz (gg.pankr.RNAase) nach Phenol auch eine Verschiebung des Hauptsedimentationsortes von 27 S nach 19 S einhergeht (Abb.11). Nach FRANCKE und HOFSCHEIDER sedimentieren mit breiten Schultern zwischen 30 S und 13 S die RI's bei 19 S, wobei ihr genauer Sedimentationsort von der Zahl der wachsenden Produktstränge pro Replikationskomplex abhängig ist (vgl. Abb. 1).

Tabelle 4 Auswertung der Sedimentationsprofile replikativer M12-RNA vor und nach Phenol (Abb.11)

	vor Phenol (Zellextrakt)	nach Phenol	Veränderung[Δ%]
Verteilung der Radioaktivität: aufgetragen [cpm] gefunden [cpm] = 100 %	4800 4700	4250 4110	
davon [%]:			
schneller als 27 S	11,9	0,49	- 11,4
27 S -Fraktion	51,7	20,70	- 31,0
19 S -Fraktion	18,4	59,50	+ 41,4
15 S -Fraktion	9,4	20,80	+ 11,4
langsamer als 15 S	8,1	4,60	- 3,5
Resistenz gegen pankr.RNAase [%]			
gesamt	20,5	50,5	+ 30,4
27 S-Fraktion	13,5	26,7	+ 13,2
19 S-Fraktion	30,1	63,2	+ 32,1
15 S-Fraktion	45,1	67,7	+ 22,6

Eine weitere deutliche Veränderung der Sedimentationseigenschaften findet sich im schnellaufenden Material (Abb. 11). Wie die Figur a) zeigt, bandiert eine Fraktion im Bereich um 40 S, wo nach WEISSMANN u.a. 1963 der sog. Replikationskomplex aus Replikase und RNA erscheint. Dieser Komplex wird nach Deproteinisierung natürlich aufgelöst und die in ihm enthaltene RNA erscheint an anderen Positionen.

Eine genaue Auswertung der beiden Sedimentationsprofile von Abb. 11 läßt sich der Tabelle 4 entnehmen, die auf der vorigen Seite wiedergegeben ist. Es wird deutlich, daß auf Kosten der schnellaufenden RNA nach Phenolisation die 19S- als auch die 15S-Fraktion zunehmen: um jeweils 41% bzw. 11%. In diesen beiden Fraktionen erhöht sich die Resistenz gegen pankr. RNAase um 32% bzw. um 22%, auch die Resistenz noch bei 27 S bandierender RNA ist um 13% erhöht (Die Angaben in $\Delta\%$ der Tabellen beziehen sich immer auf die Veränderung nach Phenolisation). Wie zu erwarten ist die geringste Resistenz aller Fraktionen gegen die pankr. RNAase bei 27 S anzutreffen. Dort sedimentieren neben schnellaufenden RI's auch die während der Pulsmarkierungszeit freigewordenen Einzelstränge, die gegen dieses Enzym sensitiv sind.

Es ist auffällig, daß nach Deproteinisierung der Gesamtgipfel im Gradientenprofil schlanker ist. Auch die Schulter bei Fraktion 28 (langsamer als 15 S laufendes Material), die im Rohextrakt noch 8,1% der gesamten replikativen RNA ausmacht, verringert sich auf 4,6%. Diese Beobachtung ist eine Bestätigung dafür, daß nicht etwa einzelsträngige RNA während der Phenolisation degradiert wird und so zur Verschiebung des Profils führt. Solche degradierte RNA fände sich nämlich bei 11S (vgl. Abb. 10) -- wie auch eigene Beobachtungen wenig sorgfältiger Aufarbeitungen bestätigen (ohne Abb.) --.

3. Zwischendiskussion der gefundenen Resultate

Die im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse bestätigen deutlich, daß sowohl der RI ['19S-Material'] als auch der RF ['15S-Material'], die nach Phenolextraktion früher in M12 infizierten Bakterien gefunden wurden, aus primär einzelsträngigen Formen hervorgehen und erst durch die Reinigungsprozedur ihre Sekundärstruktur im beschriebenen Maße entfalten (Literaturwerte für den RI: ca. 60% Resistenz gegen pankr. RNAase, RF ca. 90 Prozent).

Für diese Feststellung spricht am deutlichsten, daß die Resistenz gegen pankr. RNAase in den Gradientenpositionen beider Intermediärformen nach Phenol zunimmt. Gleichzei-

tig verschiebt sich das Material auf dem Gradienten auf langsamere Positionen. So läßt sich erkennen, daß sowohl der RI als auch der RF, die nach Deproteinisierung puls-markierter RNA bei 19 S bzw. 15 S sedimentieren und eine hohe RNAase-Resistenz aufweisen, bei der Reinigung aus RNA-Molekülen entstehen, die eine geringe Resistenz und höhere Sedimentationszahl haben, also einzelsträngig sind.

In der 19S-Fraktion nach Phenol findet sich eine Resistenz von 63,2%, was sich gut mit früheren Messungen für den M12 RI von AMMAN u.a. 1964 b, FRANKE und HOFSCHEIDER 1966 so - wie FRANKLIN 1966 deckt.

Die RNAase-Resistenz in der 15S-Fraktion nach Phenol ist mit 67,7% etwas geringer als die für den gereinigten RF früher angegebenen Werte. Wahrscheinlich sedimentiert an dieser Stelle noch ein Teil der langsamen RI's, die somit die Gesamtresistenz gegen pankr. RNAase drücken.

Daß sich in den Replikationskomplexen vor Phenol überhaupt eine Gesamt-Resistenz gegen pankr. RNAase von 20,5% findet dürfte ziemlich sicher auf Renaturierung der RNA während der Präparation des Zellextraktes, beim 'Warten' bis zum Beginn des Gradienten o.ä. zurückzuführen sein.

Zusammenfassend bleibt als wichtigstes Resultat die Zunahme der Resistenz gg. pankr. RNAase sowohl in der Position des RI als auch des RF nach Phenol festzuhalten.

E. Sekundärstruktur von M12- RNA, die für 15 Minuten radioaktiv markiert wird ['Langzeit-RNA']

1. Fragestellung

Bei den meisten in der Literatur über kleine RNA-Phagen angegebenen Werten beziehen sich die Autoren auf Strukturen, die für mehrere Minuten radioaktiv markiert wurde. Um den Vergleich mit diesen Arbeiten zu ermöglichen, wurde von uns auch das Verhalten von RNA untersucht, die für 15 Minuten markiert wurde.

2. Experimenteller Befund

Die Sedimentationsprofile der langzeitmarkierten M12-RNA zeigen im Vergleich mit den entsprechenden Profilen

pulsmarkierter RNA deutliche Unterschiede (Abb. 12 auf dieser Seite im Vergleich mit Abb. 11 S.61). Am auffälligsten ist das Ausbleiben der Verschiebung des 27 S-Gipfels nach Phenol zur 19-S-Position der Intermediärformen.

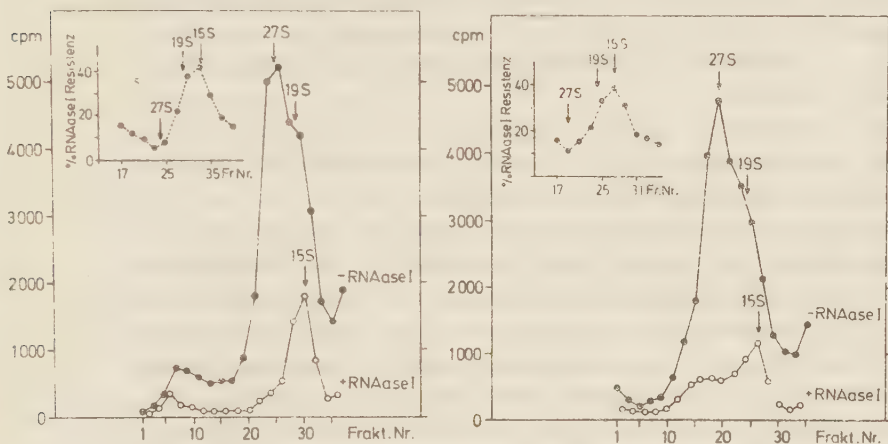


Abb. 12 Sedimentationsprofil von langzeitmarkierter M12 RNA, a) -links- vor und b) -rechts- nach Phenol-extraktion. Laufzeit des Gradienten 90 min.

Tabelle 5 Auswertung der Sedimentationsprofile langzeitmarkierter M12-RNA vor und nach Phenol (Abb.12)

	vor Phenol (Zell-extrakt)	nach Phenol	Veränderung[%]
Verteilung der Radioaktivität: aufgetragen [cpm] gefunden [cpm] = 100 %	35000 34326	32000 31617	
davon [%] :			
schneller als 27 S	15,9	4,10	- 11,8
27 S -Fraktion	48,3	64,20	+ 15,9
19 S -Fraktion	17,1	13,10	- 4,0
15 S -Fraktion	11,5	10,50	- 1,0
langsamer als 15 S	7,7	7,90	+ 0,2
Resistenz gegen pankr. RNAase [%]			
gesamt	21,2	24,40	+ 3,4
27 S-Fraktion	8,0	12,0	+ 4,0
19 S-Fraktion	30,2	30,8	+ 0,4
15 S-Fraktion	42,0	40,0	- 2,0

Vor und nach Phenolisierung bietet das Gradientenprofil und die RNAase-Resistenz der einzelnen Fraktionen in nahezu identisches Bild, wenn man vom schnellaufenden Material vor Phenol absieht (wobei es sich um RNA handeln dürfte, die bereits in Phagen eingebaut ist und bei 74 S bandiert). Diese schnellaufende RNA erscheint nach Phenol bei 27 S, an der Position der einzelsträngigen RNA (vgl. Tabelle 5).

Es ließ sich dies Profil sehr gut reproduzieren, ebenfalls die Unfähigkeit der langzeitmarkierten RNA zur Renaturierung durch Wärme oder Phenol.

Als auffällige Unterschiede im Vergleich zur kurzzeitmarkierten RNA bleibt also festzuhalten, daß nach Phenolisierung der langzeitmarkierten RNA die Gesamtresistenz gegen pankreatische RNAase nur um 3,4% zunimmt, daß eine Verlagerung des Hauptsedimentationsortes nur von schneller als 27 S laufender RNA nach 27 S hin zu beobachten ist (-11,8 % bzw. +15,9 %) und daß die am Ort der Intermediärformen bandierende RNA eher abnimmt (-4,8 %). Die Resistenz der Intermediärformen nimmt nach Phenol nur verschwindend bei 19 S zu (+0,4%) und bei 15 S sogar deutlich ab (-2,0%).

3. Vorläufige Diskussion der Resultate

Im Vergleich zum starken Anstieg der Resistenz gegen pankreatische RNAase, der sich bei der pulsmarkierten M12-RNA findet, ist die gleiche Resistenz der langzeitmarkierten RNA vor und nach Phenolisierung interessant und zu nächst überraschend. Offenbar werden während der 15 Minuten, die für den Einbau der radioaktiven Vorstufen erlaubt wurden, bereits in der infizierten Zelle Strukturen ausgebildet, die doppelsträngig (20% Resistenz gegen pankr. RNAase) und nicht weiter renaturierungsfähig sind. Der Wert für die Resistenz gegen pankr. RNAase im Rohextrakt war im Gegensatz zu den Messungen an pulsmarkierter RNA sehr konstant.

Dieser Befund spricht dafür, daß im Fall der langzeitmarkierten RNA keine replikative RNA untersucht wird. Die Radioaktivität wird offensichtlich bereits zum größten Teil während der Anfangszeit der Markierung eingebaut und liegt

zum Zeitpunkt der Analyse bereits in 'Fertigprodukten' (fertige Einzelstränge, Phagen, 'Abfall') vor. Diejenige Markierung, die erst wenige Sekunden vor der Analyse noch eingebaut wurde, also in noch aktuell replizierenden Strukturen vorliegt, geht demgegenüber unter. Ihre Renaturierungsfähigkeit nach Phenol schlägt sich bestenfalls im geringen Anstieg der Resistenz gegen pankr. RNAase um 3,4% nieder.

Es wird aber nach diesen Ergebnissen auch deutlich, daß die von früheren Veröffentlichungen genannten doppelsträngigen RNA-Populationen, die aus infizierten, langzeitmarkierten Zellen nach Phenol gewonnen wurden, keine reinen Isolationsartefakte darstellen. Offenbar kommen solche doppelsträngigen Komplexe zu einem gewissen Prozentsatz bereits in vivo vor. Sie lassen sich, nach Reinigung der Phagen-RNA aus den Zellen, nicht mehr von den erst durch die Deproteinisierung entstandenen Doppelsträngen unterscheiden. Festgehalten werden muß jedoch, daß die replizierende RNA aus einzelsträngigen Formen aufgebaut ist, die erst nach Renaturierung - in vivo oder in vitro - die bekannten doppelsträngigen Intermediärformen hervorbringen.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten solcher RNA-Doppelstränge bereits in vivo wäre, daß die RNA-Replikation nicht immer fehlerfrei abläuft, sondern durch bestimmte molekulare Ereignisse wie Bruch, Lesefehler u.ä. blockiert werden kann. Solche Komplexe könnten dann liegen bleiben, die Replikase würde sich nach einiger Zeit vom Komplex trennen, der dann relativ leicht renaturiert. Wir hätten dann in diesem Fall soetwa wie 'gealterte' Replikationsformen vor uns. Diese könnten, wenn man weiter spekulieren will, sogar eine Rolle für die Regulation der Virusprotein-Translation ausüben, indem bestimmte Regionen auf der RNA durch partielle Renaturierung den Ribosomen entzogen werden u.s.w.

F. Bestimmung der Sekundärstruktur der negativen und positiven replikativen Intermediärformen (Minus - bzw. Plusstrang-synthetisierender RI)

1. Einführung in das Problem und die Lösungsmöglichkeiten

Nach den Befunden von KOLAKOFSKI und WEISSMANN 1971 an Q_{β} -infizierten Bakterien bedarf es eines eigenen Mechanismus, der es der Replikase erlaubt, den viralen Plusstrang, der gleichzeitig als Vorlage zur Proteinsynthese dient, zu replizieren. Beide Biosynthesen laufen über den als Vorlage dienenden Plusstrang in gegensinniger Richtung ab: Die Proteinbiosynthese (Translation) in der 5'-3'-Richtung, die RNA-Synthese umgekehrt [vgl. das Schema Abb. 13 auf dieser Seite unten].

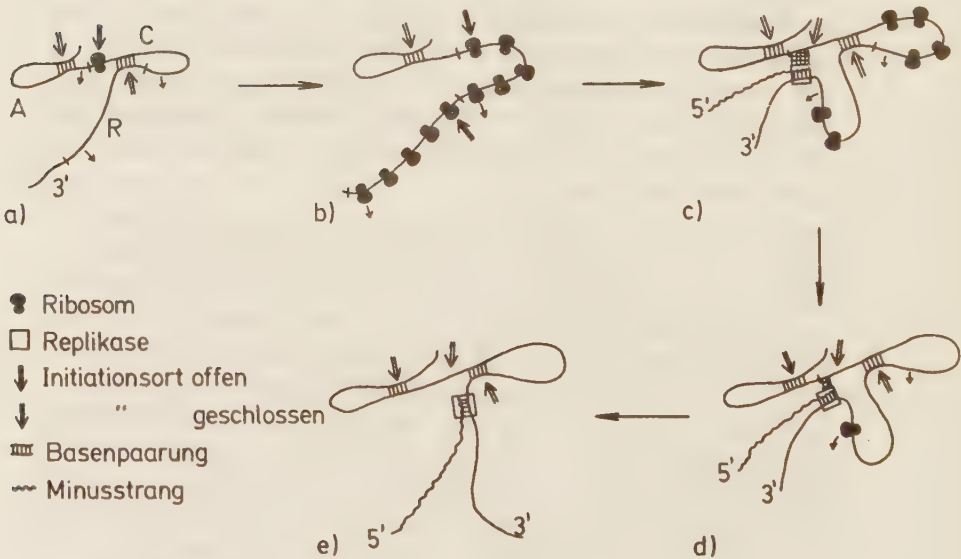


Abb. 13 Schematische Darstellung der Initiation der RNA-Synthese am translatierten Plusstrang nach KOLAKOFSKI und WEISSMANN 1971 verändert. Die Translation beginnt am offenen Initiationsort für Hüllprotein (a) und umfaßt danach auch das Replikase-Gen (b). Die Replikase bindet am 3'-Ende und blockiert damit die Translation (c).

Nach der Virusinfektion muß zunächst einmal die Synthese der Virusproteine anlaufen. Erst eine Zeit danach steht die vom Virus mitkodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase zur Verfügung. Zur Zeit des Auftretens der ersten fertigen Replikasemoleküle ist der eingedrungene virale Plusstrang jedoch fest in der Hand der Ribosomen, die die Gene für das Hüllprotein [C] und die Replikase [R] translatieren (Abb. 13 a und b).

Nach der Hypothese von KOLAKOWSKI und WEISSMANN 1971 vermag die Replikase jedoch an zwei Punkten der translatierten RNA zu binden: An ihrem Initiationsort nahe dem 3'-Ende und am Initiationsort für das Hüllprotein, wobei sie die RNA zu einem Kreis schließt (Abb. 13 c). Nach unseren Kenntnissen wird dadurch die Translation des gesamten RNA-Strangs unterbrochen: Die bereits auf der RNA synthetisierenden Ribosomen beenden die Proteinsynthese zwar noch, die Initiationsorte sind jedoch unzugänglich (der Initiationsort für A-Protein ist normalerweise geschlossen, der Initiationsort für die Replikase nur offen, wenn das Hüllprotein translatiert wird, dessen Initiationsort die Replikase blockiert).

Die Konkurrenz zwischen Replikase und Ribosomen besteht am Plusstrang während der gesamten RNA-Synthese, nicht nur vor dem ersten Einsatz der Replikase; sie besteht jedoch nicht am Minusstrang als Vorlage.

Details über die Synthese der Virusproteine und ihre Regulation sind den Arbeiten von WARD u.a. 1970, EGGEN und NATHANS 1969 sowie NOLL und NOLL 1972 zu entnehmen.

Sobald die letzten Ribosomen die RNA entlassen haben (Abb. 13 d), beginnt die Replikase mit der Replikation dieses Genabschnittes. Kommt sie in die Nähe des Initiationsortes für die Synthese des Hüllproteins (Abb. 13 e), muß sie aus sterischen Gründen die Bindung an dieser Stelle beenden, wodurch dieser Initiationsort für die Ribosomen wieder offensteht und eine neue Translationsrunde beginnt. Man kann sich vorstellen, daß es unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich ist, daß an diesem noch zuende replizierten Plusstrang noch ein zweites Replikasemolekül anheftet und gleichzeitig mit der Synthese eines weiteren Minus -

stranges beginnt. Daran hindern es schon die Ribosomen, die inzwischen schon wieder den Plusstrang translatieren.

Gerade aber diese gedankliche Konsequenz aus dem Modell von KOLAKOWSKI und WEISSMANN 1971 konnte bislang nicht nachgeprüft werden, böte jedoch eine gute Verifikation dieser Hypothese. Mit den von uns entwickelten Mitteln zur Bestimmung der Struktur der Intermediärformen sollte diese Verifikation jedoch möglich sein, wenn es gelingt, zwischen den positiven und negativen RI's (Plusstrang- bzw. Minusstrang-synthetisierender RI) zu unterscheiden.

Am Minusstrang, bei der Synthese der Plusstränge (Abb. 1b) behindern keine Ribosomen die Replikation, da der Minusstrang nicht als Template für die Translation akzeptiert wird. Es ist also hier nicht unwahrscheinlich, daß mehrere Replikasemoleküle gleichzeitig dasselbe Molekül ablesen, wodurch RI-Strukturen mit mehreren wachsenden Plussträngen entstehen würden. RI-Moleküle mit mehreren Produktsträngen beobachteten THAN und THAN 1974 im Elektronenmikroskop, sie wurden auch von KONINGS u.a. 1970 isoliert. Es konnte jedoch nicht entschieden werden, ob solche Strukturen nur bei der Synthese des Minus- oder Plusstranges oder beider Stränge auftreten.

Technisch ist es durchaus möglich, im Rohrzuckergradienten zwischen beiden RI-Formen zu unterscheiden, da solche mit mehreren Produktsträngen deutlich schneller sedimentieren (vgl. Abb. 1 c und KONINGS u.a. 1970).

Diese postulierten Eigenschaften der beiden RI-Populationen (neg. RI mit nur einem Produktstrang nur langsam, pos. RI mit teilweise mehreren Produktsträngen auch schneller) können nachgeprüft werden, wenn eine separate Analyse etwa für die negativen RI's möglich ist. Die beiden einfachsten Wege für eine solche Analyse sollen nun besprochen werden:

- a) Aufklärung des Mechanismus der Minusstrangsynthese durch Einsatz parental radioaktiv markierter Impfphagen

Die radioaktiv markierte RNA der infizierenden Phagen erscheint im Laufe des Infektionszyklus in folgenden Strukturen: (1) in Polysomen, die schneller als 70S sedimentieren. Sie erscheinen jedoch nicht in den von uns verwendeten Gradienten, weil die Polysomen im SSC-Puffer zerfallen.

(2) als einzelsträngige RNA mit dem Sedimentationswert von 27 S, (3) während der Synthese von Minussträngen als negativer RI, (4) als Replikationskomplex bei 40 S und evtl. (5) eingebaut in Tochterphagen bei 74 S.

Im Sedimentationsbereich langsamer als 27 S erscheint der parentale Strang nur als negativer RI. Analysiert man also das Sedimentationsverhalten dieser parentalen RNA während der Phagenreplikation, so läßt sich über ihren Sedimentationsort eine Aussage über die Struktur des negativen RI's machen und damit über den Mechanismus der Synthese der Minusstränge.

b) Aufklärung des Mechanismus der Minusstrangsynthese durch Hybridisierungsexperimente

Schmilzt man teilweise doppelsträngige RNA in Gegenwart eines Überschusses von Plusstrang-RNA auf und erlaubt danach die Renaturierung, so haben statistisch gesehen nur die Minusstränge der ursprünglich doppelsträngigen Moleküle eine Chance zur Renaturierung.

Setzt man in dieses Experiment die radioaktiv pulsmarkierte replikative RNA ein, so findet man nach der Renaturierung nur die Minusstranganteile als doppelsträngige, gegen pankr. RNAase resistente RNA wieder.

Macht man eine derartige Analyse für die einzelnen Fraktionen eines Gradienten mit replikativer RNA, so kann man für die einzelnen Sedimentationspositionen bestimmen, ob und wieviel Minusstrang-RNA hier zur Zeit der Pulsmarkierung synthetisiert wurde.

Mit dieser Methode sollte es also ebenfalls möglich sein, das Sedimentationsverhalten der negativen RI's zu ermitteln.

Beide Methoden können also eine Verifikation der Hypothese von KOLAKOSKI und WEISSMANN 1971 erlauben, falls sich herausstellt, daß unter den Molekülen des neg. RI tatsächlich nur langsam - zwischen 15 S und 19 S - sedimentierende Vertreter vorkommen.

Im folgenden werden zunächst die Resultate mit parental markierten Phagen, danach die mit Hybridisierungsexperimenten dargestellt.

2. Experimentelle Ergebnisse

a. Experimente mit parental markierten Phagen

α . Strukturaufklärung der negativen RI's

Eine logarithmisch wachsende Kultur E.coli AB 301-105 wurde mit ^{32}P markierten M12-Phagen infiziert und 20 Minuten nach Infektion durch rasches Abkühlen gestoppt.

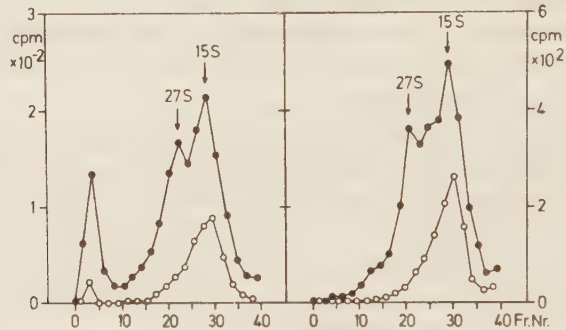


Abb. 14 Sedimentationsprofile von RNA aus ^{32}P -M12-infizierten E. coli AB 301-105 (a) -links- vor - und (b) -rechts- nach Phenol. Laufzeit des Gradienten 120 min [45000 UpM, SW.50,1, 4°C].

Tabelle 6 Auswertung der Sedimentationsprofile parental markierter M12-RNA vor und nach Phenol (Abb.14)

	vor Phenol (Zellextrakt)	nach Phenol	Veränderung [Δ %]
Verteilung der Radioaktivität:			
aufgetragen [cpm]	34000	64500	
gefunden [cpm]	33830	63510	
= 100 %			
davon [%] :			
schnelle Fraktion (>40S)	15,72	1,8	- 13,9
27 S -Fraktion	31,54	37,0	+ 5,5
19 S -Fraktion	8,63	11,3	+ 2,7
15 S -Fraktion	44,17	52,9	+ 8,7
Resistenz gegen pankr. RNAase [%]			
27 S -Fraktion	27,3	38,1	+ 10,8
19 S -Fraktion	21,1	14,1	- 7,0
15 S -Fraktion	37,3	33,1	- 4,2
40,6		48,0	+ 7,4
>40 S -Material	8,9	n.g.	(- 8,9)

Zu dieser Zeit findet sich nach WEISSMANN 1964 und ERIKSON u.a. 1964 in der infizierten Zelle die größte Resistenz gegen pankr. RNAase bei der parentalen RNA, d. h. die infizierenden Virus-RNA-Moleküle befinden sich am häufigsten in Replikationskomplexen.

Die Bakterien wurden durch zweimalige Behandlung mit dem Ultraturrax für eine Minute 'abgeschert', um die freien Phagen, deren RNA nicht penetriert hat, von den Zellen zu entfernen. Die gewaschenen Bakterien wurden in zwei gleiche Teile geteilt und der Zellextrakt bzw. die gereinigten Nukleinsäuren präpariert.

Danach wurde mit dem KOH-Test kontrolliert, ob die ^{32}P - Markierung womöglich in DNA eingebaut worden ist, was ein Zeichen für Degradation der parentalen RNA in den Zellen wäre. Es wurde bei der markierten Nukleinsäure jedoch nur eine KOH-Resistenz von 0,93% gefunden, was unterhalb der methodischen Genauigkeit liegt.

Die präparierte RNA wurde der Inkubation mit pankr. RNAase ausgesetzt. Im Rohextrakt fand sich eine Resistenz von 27,3%, nach Phenol von 38,1% (Tabelle 6 auf der vorher - gehenden Seite). Diese Renaturierung von 11 % nach Phenol spricht dafür, daß mindestens ein Teil der Plusstränge, welche die Zellen infiziert hatten, zum Zeitpunkt der Analyse in Replikationskomplexe eingebaut sein mußten.

Die Sedimentationsprofile dieser RNA nach Zentrifugation durch einen linearen Rohrzuckergradienten zeigt die Abb. 14 auf der vorhergehenden Seite. Man erkennt auf den beiden Profilen drei Hauptgipfel: den stärksten bei 15 S, dem Sedimentationsort des RF und der langsamen RI's, einen bei 27 S, wo die freien Einzelstränge sedimentieren (schnelle RI's evtl.) und einen weiteren Gipfel bei dem Profil aus dem Rohextrakt: schnellaufendes Material, das auf das Kissen aus 60 % Rohrzucker sedimentiert und nach Phenolisierung verschwindet (reife Phagen oder Ribonukleotid-Proteinkomplexe).

Die Resistenz gegen pankr. RNAase ist mit 44,2 bzw. 52,9 Prozent bei 15 S am größten, was dafür spricht, daß hier Replikationsformen vorliegen. (im Gradientenprofil: offene Kreise). Im einzelnen ist, wie die Tabelle 6 im einzelnen zeigt,

als besonders krasser Unterschied zu den vergleichbaren Gradientenprofilen pulsmarkierter RNA (Abb. 11) festzustellen, daß sich die im Rohextrakt befindlichen Intermediärformen nach Deproteinisierung nicht nach 19 S, dem Sedimentationsort der schnelleren RI's mit mehreren wachsenden Strängen, sondern nach 15 S verschieben, wo die langsameren RI's bandieren. Dies Maximum fand für phenolisierten parental markierten R17-RI auch ERIKSON und ERIKSON 1967.

Man kann sich diesen Unterschied durch einen Vergleich der $\Delta\%$ -Werte von Tabelle 4 (S. 62) und Tabelle 6 (S. 72) verdeutlichen. Bei der pulsmarkierten RNA (Tab. 4) nimmt die 19S-Fraktion nach Phenol viermal mehr zu als die 15S-Fraktion (41,4 zu 11,4%). Dies Verhältnis ist bei der parental markierten RNA nahezu umgekehrt (2,7 zu 8,7 Prozent nach Phenol).

ß. Zwischendiskussion

Diese ersten Experimente zur Klärung der Struktur der negativen RI's zeigen bereits deutliche Unterschiede zwischen der gesamten replikativen RNA und den separat markierten negativen RI's. Diese finden sich nach Phenolisation nicht in der 19 S-Position, wo die meisten RI-Moleküle bandiert (mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit), sondern bei 15 S, wo die langsamen RI's und die RF-Fraktion laufen. Beide Molekülgruppen zeichnen sich dadurch aus, daß am Vorlagestrang nur jeweils ein Produktstrang sitzt (vgl. Abb. 1c).

Dieser erste Befund spricht bereits deutlich für die von uns in der Einführung zu diesen Experimenten beschriebene Arbeitshypothese, daß die Konkurrenz zwischen Replikase und Ribosomen bei der Ablesung des viralen Plusstranges dazu führt, daß am Plusstrang in den allermeisten Fällen nur ein Produktstrang (Minusstrang) gebildet wird, die Klasse der negativen RI's folglich langsamer sedimentiert als die Hauptmasse der RI's, bei denen die Moleküle mit mehreren Produktsträngen nicht selten sind.

b. Hybridisierungsexperimente

α. Strukturaufklärung der negativen RI's

Das Sedimentationsprofil gereinigter replikativer RNA, die Fraktion für Fraktion mit Überschuß an unmarkierter Plusstrang-RNA renaturiert und alternierend mit pankreatischer RNAase verdaut wurde, zeigt Abb. 15. In der oberen Kurve (geschlossene Kreise) erkennt man deutlich das Sedimentationsprofil der replikativen RNA nach Phenol (vgl. Abb. 11 b).

Die zweite Kurve (offene Kreise) zeigt die Menge RNA an, die in Gegenwart eines Überschusses an unmarkierter Plusstrang-RNA hybridisierbar ist [=Resistent gegen pankr. RNAase nach Hybridisierung]. Diese Kurve gibt also den Minusstranganteil in der radioaktiv markierten replikativen RNA an und ist somit der Indikator für die Verteilung des negativen RI.

Es dürfte interessant sein, sich beim Vergleich der Pro-

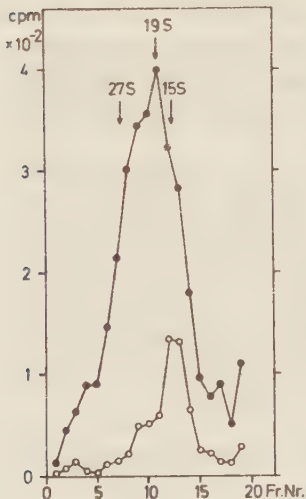


Abb. 15

Hybridisierung von fraktionierter replikativer M12-RNA nach Phenol. Die RNA wurde zunächst für 120 min auf dem Standard-Rohrzuckergradienten zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden danach in Gegenwart eines Überschusses an Plusstrang-RNA aufgeschmolzen und renaturiert. Jede Fraktion wurde danach geteilt: zwei Aliquots wurden in 5% TCA gefällt [●-●], die beiden anderen Aliquots wurden vor der TCA-Fällung in pankr. RNAase inkubiert [○-○]. Aufgetragen sind die Mittelwerte beider zugeh. Aliqu.

file nach Inkubation mit pankr. RNAase von Abb. 11 b und Abb. 15 über den völlig verschiedenen Aussagewert die - ser Parameter zu verständigen; Wird einfach replikative RNA mit pankr. RNAase verdaut, so geben diese Werte den Anteil doppelsträngiger RNA an (Abb. 11 b). Beim Gradienten-

profil nach Hybridisierung zeigt die Resistenz gegen pankreat. RNAase jedoch an, wieviel RNA pro Fraktion in der Lage ist, nach Aufschmelzen wieder mit Plusstrang-RNA eine Doppelhelix zu bilden. Diese, gegen pankr. RNAase resistente Radioaktivität wurde während der Pulsmarkierung also in Minusstränge eingebaut!

Tabelle 7 Vergleich der Gradientenprofile gereinigter replikativer RNA ohne (Abb. 11b) und mit Hybridisierungsschritt vor der TCA-Fällung (Abb. 15).

Eingesetzte Radioaktivität [cpm] wiedergefunden [cpm] davon [%] schnellaufende RNA 27S-Fraktion 19S-Fraktion 15S-Fraktion langsamer als 15 S	Ohne Hybridisierung (Abb. 11)	Nach Hybridisierung (15)	% Resistenz gegen p.RN-Aase der hybr.RNA
	4250 4110	6400 6280	
	0,5	3,8	n.g.
	20,7	21,3	7,0
	59,5	51,2	14,5
	20,8	17,7	47,4
	4,6	6,7	n.g.

Aus Tabelle 7 läßt sich entnehmen, daß durch die Hybridisierungsprozedur das Sedimentationsprofil der phenolisierten replikativen RNA in seinen Hauptmerkmalen nicht verändert wurde (Vergleich der beiden ersten Spalten: TCA-fällbare RNA).

Die Verteilung des Minusstranges zeigt ein deutliches Überwiegen der 15 S -Position. Fast die Hälfte der hier, am Sedimentationsort der langsamen Intermediärformen erscheinenden RNA wurde während der Pulsmarkierung in Minusstränge eingebaut (47,4 %). Dagegen ist noch nicht einmal ein Sechstel des bei 19 S und weniger als ein Zehntel des bei 27 S sedimentierenden replikativen Materials Minusstrangs -anteil (14,5 bzw. 7,0 %).

Analysiert man die pulsmarkierte fraktionierte RNA durch Hybridisierungsexperimente nicht nach Phenol, sondern vor der Deproteinisierung, so zeigt sich prinzipiell ein ähnliches Bild (Abb. 16 auf der folgenden Seite).

Die Werte für die Minusstranganteile der einzelnen Haupt -fraktionen vor Phenol variieren allerdings etwas von denen nach Phenol, die in Klammern zum Vergleich angegeben wer-

den: 27 S-Fraktion 7,5 % (7,0%), 19 S-Fraktion 25,0 % (14,5 %), 15 S-Fraktion 34,5 % (47,4 %). Nach der Reinigung ist also auch bei den negativen RI's eine Verschie-

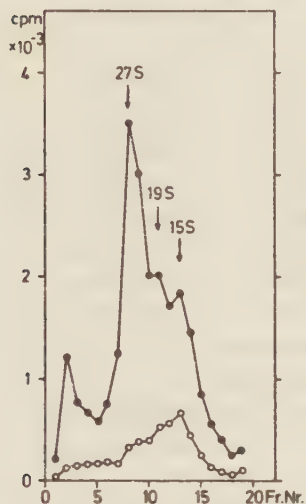


Abb. 16
Hybridisierung von fraktionierter replikativer M12-RNA aus dem Rohextrakt der infizierten Zellen (vor Phenol). Alle übrigen Angaben wie bei Abb. 15 auf S. 75

bung zu niedrigeren Sedimentationswerten zu beobachten: Während die bei 19 S bandierenden langsamen negativen RI Moleküle nach Phenol abnehmen, nehmen die an der RF-Po - sition bandierenden Moleküle zu. Die Verschiebung umfaßt etwa 11 % der Gesamtradioaktivität.

Bei der Gesamtheit der replikativen Intermediärformen, deren Verschiebung nach Phenolisierung in Tabelle 4 zusammengefaßt ist, beobachten wir abweichend von den negativen RI's eine Rechtsverschiebung auf dem Gradienten, die bereits bei den Fraktionen um 27 S und schneller ansetzt und der 19-S Fraktion einen beträchtlichen Zuwachs bringt. Dieser Zuwachs (+ 41,4%) fehlt der neg. RI-Fraktion fast vollständig (+ 0,5%). Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß im nativen minusstrangsynthetisierenden replika - tiven Material praktisch keine schnelllaufenden Strukturen vorkommen.

B. Zwischendiskussion

Die Hybridisierungstechnik bietet sich als zweite Methode zur Kontrolle des Mechanismus der Minusstrangsynthese in Picornavirus-infizierten Bakterien an. Die wichtigsten technischen Vorarbeiten für unsere Experimente leisteten WEISSMANN 1964 sowie NEHLMANN und HOFSCHNEIDER 1970 mit ihren Hybridisierungen an Q β - und M12-RNA. Keine dieser Methoden ist jedoch ideal für die hier verfolgten Zwecke. Als Modifikation wurde der in der Sektion Nr. 22 auf S. 40 beschriebene Weg eingeschlagen: Die RNA der einzelnen Gradientenfraktionen wurde in 'niedrigem Salz' [5 mM EDTA] für einige Minuten bei etwa 100 °C (kochen-des Wasser) aufgeschmolzen, rasch im Eisbad abgekühlt und auf einen Ionengehalt von 2,5 · SSC gebracht. Die RNA wurde dann für sechs Tage bei 60 °C inkubiert.

Die in Abb. 17 unten auf dieser Seite wiedergegebene Kontroll-Renaturierungskinetik von M12-RF und als interner Kontrolle von Plusstrang-RNA zeigt, daß man bei der doppelsträngigen RNA erst etwa nach vier Tagen mit einer vollständigen Renaturierung der komplementären Abschnitte rechnen kann. Einzelsträngige RNA renaturiert unter den Bedingungen dieser Hybridisierungsexperimente nicht.

Die Ergebnisse der Hybridisierung replikativer RNA vor und nach Phenol, wie sie in Abb. 15 und 16 sowie Tabelle 7 zusammengestellt sind, zeigen, daß im Wirtsbakterienstamm AB 301-105 etwa 32 Minuten nach Infektion mit M 12-Phagen

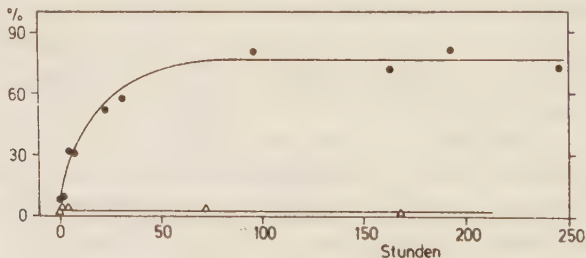


Abb. 17 Renaturierungskinetik von aufgeschmolzener M12 RF-RNA [●-●] in 2,5 · SSC bei 60 °C und einzelsträngiger M12-RNA zur Kontrolle [△-△]. Alle Bedingungen entsprechen dem bei den in Abb. 15 und 16 wiedergegebenen Experimenten. Abszisse: % Resistenz gegen pankr. RNAase.

zwanzig Prozent der in RNA inkorporierten Radioaktivität in Minusstränge eingebaut werden. Dieser Wert liegt höher als die von BILLETTER u.a. 1966 für den Phagen Q_{β} referierten Werte von 12-15%.

Die Replikationskomplexe, in denen Minusstrang-RNA synthetisiert wird, enthalten zum größten Teil nur einen wachsenden Produktstrang. Die Evidenz dafür liegt in der Verteilung der minusstrangsynthetisierenden RI's auf dem Sedimentationsprofil der replikativen RNA, wie es durch den Einsatz parental markierter Phagen und über Hybridisierungsexperimente aufgeklärt werden konnte. Bei allen Experimenten war der Hauptgipfel der negativen RI's bei 15 S, während er für die replikative Gesamt-RNA bei 19 S bzw. 27 S liegt.

Methodisch sind vor allem die Hybridisationsexperimente gut gesichert, da jedes Experiment mindestens dreimal mit verschiedenen Präparationen an replikativer RNA reproduziert wurden.

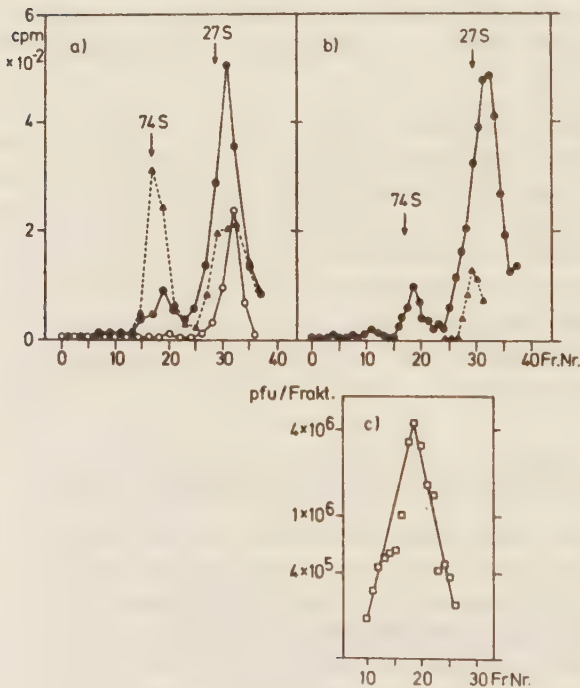
Somit kann als evident angesehen werden, daß die bislang bekannten replikativen Intermediärformen mit mehreren wachsenden Produktsträngen ("schnelle RI's") praktisch ausschließlich Plusstränge synthetisieren, also positive RI's sind. Die bei der Synthese der Minusstränge auftretenden Formen (negative RI's) besitzen fast ausschließlich nur einen wachsenden Produktstrang. Damit kann das Modell von KOLAKOWSKI und WEISSMANN 1971 als in vivo funktionell bestätigt angesehen werden.

G. Anteil der parentalen RNA, die im Laufe des Replikationszyklus in die Tochterphagen eingebaut wird

Nach einer Arbeit von DAVIS und SINSHEIMER aus dem Jahre 1963 gelangt von der infizierenden viralen RNA nichts in die Tochterphagen [die Autoren geben als Höchstgrenze 3% an, was die Fehlergrenze ihrer Methode darstellt]. Diese äußerst niedrige Rate geht seitdem durch die Literatur. Sie gibt zu vielfältigen Spekulationen über den Mechanismus Anlaß, durch den der Ausschluß der parentalen RNA vor dem Einbau in die Nachkommenphagen bewirkt werden soll.

Vor allem seit DOI und SPIEGELMAN 1963 für dieselben Phagen zeigen konnten, daß die parentale RNA während der Replikation der Phagen in der Bakterienzelle nicht degradiert wird, war der Befund von DAVIS und SINSHEIMER 1963 unverständlich geworden.

Infiziert man Wirtsbakterien mit Phagen, die mit ^{32}P markiert sind, so findet sich im Sedimentationsprofil aus dem Zellextrakt der infizierten Bakterien Material, das bei 74 S bandiert (Abb. 14 links, S.72). Man muß annehmen, daß die parentale RNA entweder in Replikationskomplexe oder jedoch in fertige Phagen eingebaut ist. Um zwischen beiden Formen (40 S oder 74 S, die bei den für 120 min zentrifugierten Gradienten auf das 60%ige Kissen sedimentieren, unterscheiden zu können, muß man dasselbe



Material wesentlich kürzer zentrifugieren (60 min).

Abb. 18 a auf dieser Seite zeigt, daß die schnelle RNA-Fraktion mit dem ^3H -M12-Marker zusammenfällt. Die in Abb. 18 b und c gegebene Auswertung desselben Gradienten ohne externen Marker beweist, daß das schnelle Material mit dem Gipfel der biologisch akti-

Fig. 18 Sedimentationsprofil von RNA aus ^{32}P -M12-infizierten Bakterien. Zentrifugationszeit 60 min. [●—●] TCA-fällbare cpm, [▲—▲] ^3H M12 Marker; ^3H 35S-RNA.

ven Phagen (pfu/ml in Abb. 18 c gibt die Auswertung von Fraktion 10 bis 26 des in Abb. 18 b dargestellten Gradienten im Plaquetest wieder, die offenen Quadrate stellen Plaquezahlen/ml dar) läuft. Ein Teil der parentalen RNA könnte also entgegen den Aussagen von DAVIS und SINSHEIMER doch in Phagen eingebaut sein.

Für die Fragestellung, ob parentale Virus-RNA in Tochterviren eingebaut wird oder nicht, sagt dieser Befund jedoch nicht viel aus. Es ist möglich, daß sich in der Präparation der Virus-RNA noch Impf-phagen als Kontamination befinden, die nicht penetrierten und so intakt erhalten blieben.

Zur Kontrolle, ob es sich um eine solche Impfphagen-Kontamination oder um neugebildete Phagen handelt, wurde ein neues Experiment angesetzt. Die Wirtszellen wurden diesmal 10 min nach Zugabe der Phagen zweimal für eine Minute im Ultraturrax behandelt. Dadurch werden über die starken Scherkräfte im Medium die F-Pili mit den daran sitzenden Phagen abgeschert [DAVIS und SINSHEIMER]. Die Bakterienkultur wächst danach in frischem Medium weiter, in ihr ist jedoch nur noch die Radioaktivität jener viralen Nukleinsäure enthalten, mit der die Phagen in die Bakterien vor dem Abscheren eindringen (dies zeigten Kontrollexperimente bei 4 °C, einer Temperatur, bei der die Phagen zwar an die Pili anheften, jedoch nicht penetrieren können).

Nach bestimmten Zeitabschnitten nach Abscheren wurden aus der Kultur dann Aliquots entnommen und die RNA aus den so behandelten infizierten Zellen einer S_{20} -Sedimentationsanalyse unterzogen, wie sie beim vorigen Versuch beschrieben ist. Wenn es sich beim schnellaufenden Material um neugebildete Phagen handelt, sollte sein Anteil mit der Zeit nach dem Abscheren zuungunsten der langsameren RNA zunehmen.

Kontrollen zeigten, daß nach 60 Minuten nach Abscheren die bei 74 S bandierende RNA völlig resistent gegen pankreat. RNAase ist, was dafür spricht, daß sie tatsächlich in Phagen eingebaut ist. Außerdem findet sich nichts von der eingesetzten parentalen Markierung in DNA, was dafür spricht,

daß die parentalen Plusstränge nicht metabolisiert werden [DOI und SPIEGELMAN 1963]: In diesem Fall würden die ^{32}P -markierten Nukleotide auch in der zellspezifischen DNA erscheinen.

Die auf einem linearen Rohruckergradienten für 60 min zentrifugierten Aliquots, die aus der parental infizierten Kultur 5, 20 bzw. 60 min nach Abscheren entnommen wurden

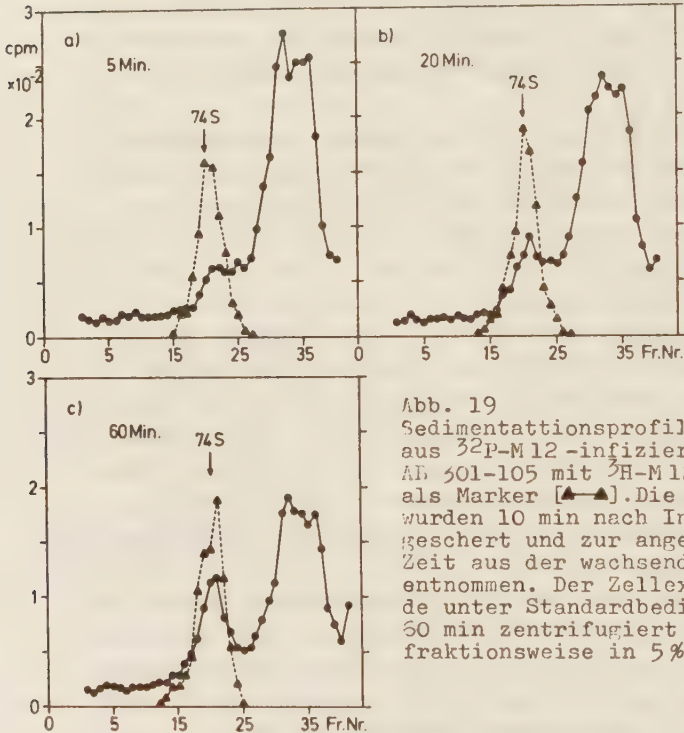


Abb. 19
Sedimentationsprofile von RNA aus ^{32}P -M12-infizierten *E. coli* AB 501-105 mit ^3H -M12-Phagen als Marker [▲-▲]. Die Bakterien wurden 10 min nach Infektion abgeschert und zur angegebenen Zeit aus der wachsenden Kultur entnommen. Der Zellextrakt wurde unter Standardbedingungen für 60 min zentrifugiert und danach fraktionsweise in 5% TCA gefällt.

Tabelle 8 Charakterisierung der Sedimentationsprofile der in Abb. 19 dargestellten Experimente

	5	20	60	Minuten nach Abscheren der Phagen
Fraktion 25 bis 40 [als % der Gesamt-RNA]	83,0	77,3	70,5	
Fraktion 15 bis 25	17,0	22,6	29,5	

den, zeigen die auf Abb. 19 wiedergegebenen Profile. Da alle Kurven den gleichen Maßstab haben, ist die Verschiebung des relativ langsam sedimentierenden Materials (40 S und langsamer: Fraktion 25 bis 40) zum schnell sedimentierenden Material hin (74 S: Fraktion 15 bis 25) deutlich abzulesen. Wie auch in Tabelle 8 auf der vorhergehenden Seite dargestellt, läßt sich im Laufe von 55 Minuten Replikationszeit eine Verschiebung von etwa 13 % der parentalen RNA errechnen. Insgesamt sedimentiert nach dieser Zeit mehr als 30 % der eingesetzten parentalen RNA.

Kontrollen ergaben dieselbe Verschiebung auch bei Bakterien des Stammes AB 301, sie ist also keine Besonderheit der verwendeten Mutante.

Der mögliche Einwand, bei der Zunahme der bei 74 S sedimentierenden RNA nach 55 min handle es sich um beim Abscheren nicht entfernte Phagen, die im Laufe der Zeit in die Zellen eindringen, läßt sich entkräften. In diesem Falle müßte auch die langsam sedimentierende RNA zunehmen (und nicht im Gegensatz abnehmen).

Aus diesem Experiment wird deutlich, daß mindestens 13 % der infizierenden RNA-Plusstränge wieder in die Phagen der Nachkommengeneration eingebaut werden.

Das Argument, diese bei 74 S gefundene RNA sei nicht intakt in die Phagen gelangt, sondern vorher abgebaut und dann neusynthetisiert worden, läßt sich nicht völlig ausschließen. Seine Richtigkeit ist jedoch nicht wahrscheinlich, aus den drei folgenden Gründen:

- a) Die Degradationsprodukte sollten sich in diesem Fall nicht nur als fertige Tochter-RNA zeigen, sondern auch als Nukleotide, Oligonukleotide etc., die oben auf dem Gradienten sedimentieren müßten.
- b) Die radioaktiven Nukleotide sollten nach der Degradation auch in zelluläre DNA eingebaut werden, was jedoch nicht der Fall ist, wie Kontrollen zeigten.
- c) Die Beobachtung von DOI und SPIEGELMAN 1963 spricht ebenfalls für die Intaktheit der infizierenden RNA nach einem vollen Replikationszyklus.

Eine letzte Sicherheit über den Transfer könnten jedoch erst Doppelmarkierungsexperimente erbringen.

D i s k u s s i o n

A. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Für die hier beschriebenen Experimente dienten Bakterien des Stammes Escherichia coli K12 AB 301-105 [KINDLER u. a. 1973] als Wirtszellen für die Replikation des unter - suchten Bakteriophagen M12. In den Zellextrakten dieser Bakterien findet sich nur etwa ein Hundertstel der RNA - ase I- und RNAase III-Aktivität, die in Wildtypzellen (E. coli K12) gemessen wurden. Somit war es zum ersten Mal möglich, die Virus-RNA direkt im Rohextrakt der infizierten Zellen zu untersuchen, ohne eine Degradation der RNA durch die zellulären Nukleasen befürchten zu müssen.

Die Virus-RNA wurde während ihrer Replikation in den infizierten Zellen durch kurzzeitige Gabe von radioaktiven Bausteinen für die RNA-Synthese gekennzeichnet ('Pulsmarkierung'). Die Charakterisierung der so markierten Ribonukleinsäure erfolgte nach ihrer Sekundärstruktur. Es wurden zwei Ribonukleasen mit konträrer Spezifität eingesetzt: Pankreatische RNAase mit der Fähigkeit, einzelsträngige RNA zu degradieren und RNAase III mit der Fähigkeit zum Abbau doppelsträngiger RNA [SPAHR u.a. 1966 sowie ROBERTSON u.a. 1968]. Das Maß der Degradation wurde durch die Fällbarkeit der inkubierten RNA in 5%iger TCA bestimmt. Dazu wird die ausgefällte RNA auf Filtern gesammelt und ihre Radioaktivität gemessen. Die Radioaktivität, die gemessen wird, ist also immer ein Maß für die Resistenz gegen das Enzym, mit dem die RNA inkubiert worden war.

Wurden nun M12 infizierte Bakterien für 20 Sekunden puls-markiert und die so gekennzeichnete RNA im Extrakt der Bakterien durch Enzymverdau charakterisiert, so fand sich eine Resistenz gegen pankr. RNAase von durchschnittlich 17 % und gegen RNAase III von 68 %. Die für die pankreatische RNAase gemessenen Werte waren für die einzelnen Präparationen reproduzierbar, wichen jedoch untereinander stark ab (5% bis 29 %). Die Werte ließen sich durch eine Inkubation bei 37°C für 15 Min. vor dem Enzymverdau

um jeweils 10% erhöhen und stiegen nach Deproteinisierung der RNA auf 50% [$\pm 1\%$] an. Auch diese Werte für die Resistenz gegen pankr. RNAase ließen sich durch entsprechend komplementäre Ergebnisse der Inkubationen mit RNAase III kontrollieren (vgl. Abb. 9).

Eine detailliertere Untersuchung der Strukturveränderungen, die pulsmarkierte RNA nach Deproteinisierung erfährt, wurde mit Hilfe von Bandsedimentationsanalysen vorgenommen. Auf linearen Rohrzuckergradienten lassen sich die beiden Hauptintermediärformen der RNA-Replikation, der RI (replikative Intermediärform) und der RF (replikative Form) trennen. Nach Deproteinisierung sind beide Strukturen zu über 60% gegen pankr. RNAase resistent. Sie leiten sich jedoch von wesentlich sensitiveren Vorstufen ab, die sich in den Zellextrakten, die nicht mit deproteinisierenden Agentien behandelt wurden, nachweisen lassen (vgl. Abb. 11 und Tabelle 4). Parallel zur Zunahme der Resistenz gegen pankr. RNAase nimmt bei diesen Molekülen nach Deproteinisierung die Sedimentationsgeschwindigkeit ab.

Während der Pulsmarkierungszeit von 20 Sekunden baut die virusspezifische Replikase 20% der radioaktiven Vorformen in Minusstränge ein. Die Replikationskomplexe, welche Minusstränge synthetisieren (negativer RI) sedimentieren mit durchschnittl. 15 S deutlich langsamer als die Gesamtheit der replikativen Intermediärformen, die im Schnitt bei 19 S bandieren. Dies wurde durch Einsatz parental markierter Phagen zur Infektion und durch Hybridisierungsexperimente festgestellt (Abb. 14 und 15, Tabelle 6 und 7).

Von anderen Autoren wurde häufig virusspezifische RNA charakterisiert, die aus Bakterien stammt, die mehrere Minuten lang mit radioaktiven Vorstufen inkubiert wurden (sog. langzeitmarkierte RNA). Um diese Arbeiten nachzuprüfen, bei denen regelmäßig in der Fraktion der gereinigten viralen Nukleinsäuren eine relativ hohe Resistenz gegen pankr. RNAase beschrieben wurde, sollten Experimente mit einer Markierungsdauer von 15 Min. durchgeführt werden. Untersucht man im Zellextrakt der langzeitmar-

kierten Bakterien die virusspezifische RNA, so findet man regelmäßig eine R_s -sistenz von etwa 20 %, die nach Wärmeeinwirkung bzw. Deproteinisierung nicht mehr nennenswert ansteigt. Es zeigt sich also, daß die gegen pankr. RNAase resistenten Strukturen auch schon in vivo entstehen können.

Es ließ sich weiterhin zeigen, daß mindestens ein Teil der infizierenden Plusstränge an die Nachkommenphagen weitergegeben werden. Die Transfer-Rate beträgt mindestens 13 %.

B. Reflexion der verwendeten Methoden

1. Selektive Synthese von virusspezifischer RNA in Gegenwart von Rifampizin

HEIL u.a. zeigten 1970, daß durch das Antibiotikum Rifampizin selektiv die β -Untereinheit der zellspezifischen DNA-abhängigen RNA-Polymerase gehemmt werden kann. Im Gegensatz dazu wird die virusspezifische RNA-abhängige RNA-Polymerase (=Replikase) durch das Rifampizin nicht gehemmt. Dies konnten für die üblichen Wirtszellen beim Bakteriophagen M12 MEIER und HOPFSCHNEIDER 1970 beweisen.

In Gegenwart von Rifampizin ist also eine selektive Markierung der virusspezifischen RNA möglich, wenn gleichzeitig eine radioaktive Vorstufe wie Urazil angeboten wird, die in DNA nicht eingebaut wird.

Wie die Vorversuche und die Routinekontrollen auf Einbau in DNA bewiesen, wird in Gegenwart von Rifampizin auch in den M12-infizierten Bakterien des neu isolierten Bakterienstammes E.coli K12 AB 301-105 [RNAase I⁻, RNAase III⁻] die Phagensynthese normal durchgeführt und von dem zugeführten radioaktiven Urazil höchstens 1-2% in DNA eingebaut (diese Werte wurden von allen Resultaten subtrahiert). Zwischen 35 und 45 Minuten nach Infektion finden sich in diesen Zellen die höchsten Syntheseraten für virale RNA, deren Synthese zu dieser Zeit linear verläuft. Es wurde durch eigene Kontrollexperimente nachgeprüft, daß Rifampizin tatsächlich in die Zellen eindringt und in vivo die DNA-abhängige RNA-Polymerase hemmt.

2. Bereitung des Zellextraktes durch Zertrümmern der Zellwände mit Glasperlen

WIESSMANN u.a. stellen 1964 eine Methode der Zellöffnung vor, bei der jegliche Einwirkung von Detergentien, Enzymen oder Chemikalien vermieden wird. Die Zellen werden dabei durch maschinelles hochfrequentes Schütteln in Puffer mit Glasperlen zertrümmert. Von uns wurde diese Apparatur noch mit einer Vorrichtung versehen, die eine Erwärmung der Zellen während des einminütigen Schüttelvorganges verhindern sollte.

Als Alternative wird in letzter Zeit eine Lyse der Bakterien mit einem nicht-ionischen Detergens wie Brij vorgeschlagen [GODSON und SIMSHEIMER 1967]. Der von uns verwendete Bakterienstamm war jedoch relativ resistent gegen dies Detergens und die Lyse zeigte eine geringe, unproduzierbare Erfolgsquote. Sogar die virusspezifischen Polysomen ließen sich durch die oben vorgestellte mechanische Methode besser präparieren, was für das schonende Vorgehen spricht [hier nicht weiter dargestellt].

Als Einwand gegen die Ergebnisse, die mit dieser Methode gewonnen wurden, könnte vorgebracht werden, daß nur deshalb im so gewonnenen Zellextrakt eine so geringe Resistenz der Virus-RNA gegen pankr. RNAase zu beobachten ist, weil durch das Öffnen der Zellen die resistenten Moleküle verlorengehen. Dieser Einwand wird dadurch entkräftet, daß nach Phenolisation der im Rohextrakt vorhandenen replikativen Virus-RNA-Moleküle wieder die resistenten Formen auftauchen.

Ebenso läßt sich der Einwand entkräften, durch die beim Öffnen auf die RNA einwirkenden Scherkräfte werde die Virus-RNA gebrochen und sedimentiere daher anders als die native RNA. Wenn nämlich derartige Bruchstücke aufträten, müßten sie zum Teil auch oben auf den Gradienten auftauchen, wo nie Radioaktivität gefunden wurde.

Ein anderer Einwand gegen die Zuverlässigkeit der im Zellextrakt gemessenen geringen Resistenz der Virus-RNA gegen pankr. RNAase könnte anders lauten. Man könnte argumentieren, daß Restaktivitäten von RNAase III im Zellextrakt die Virus-RNA gegen pankr. RNAase erst sensitiv machen [vgl.

die Beobachtung von HEILMANN und HOFSCHEIDER 1970 an RF in E.coli Protoblasten]. Auch dieser Vorgang würde eine geringe Resistenz gegen diese Ribonuklease nur vortäuschen. - Dieser Einwand wird jedoch dadurch entkräftet, daß die virale RNA im Rohextrakt noch renaturierbar ist, was man von einer durch RNAase III angegriffenen RNA nicht erwarten sollte. Ebenfalls bliebe unerklärlich, warum man in den langzeitmarkierten Zellen mehr resistente RNA findet als in den pulsmarkierten: Auch hier sollte ja derselbe Einfluß der RNAase III-Resistenzaktivität wirksam bleiben.

Die Reinigung der RNA wurde nach dem allgemein eingeführten Verfahren von SCHUSTER und SCHRAMM 1963 durch Phenol-extraktion durchgeführt, wobei die Phenolreste nach FRANKKE und HOFSCHEIDER 1969 durch Ausschütteln mit Äther entfernt wurden. Die Auswirkungen dieser Reinigung - selbst unter den von uns verwendeten Bedingungen einer Aufarbeitung bei 4 °C - werden ausführlich später diskutiert.

3. Bestimmung der Sekundärstruktur der Intermediärformen durch Inkubation mit Ribonukleasen

Die Identifikation von doppelsträngiger RNA durch Inkubation mit pankreatischer RNAase im Ionenmilieu des SSC-Puffers gehört seit mehr als zehn Jahren zu den Standardmethoden der Molekularbiologie [zusammengefaßt bei BISHOP und LEVINTOW 1971]. Diese Methode sagt jedoch nur indirekt etwas über die Struktur der RNA aus. Deshalb wurde in dieser Arbeit der experimentelle Befund mehrfach abgesichert:

- a) Die wichtigsten Experimente wurden durch parallele Inkubation mit RNAase III kontrolliert. Dabei mußten die Resistenzwerte der RNA gegen beide Enzyme addiert wegen der konträren Spezifitäten annähernd 100% ergeben.
- b) Die Reproduzierbarkeit der Ribonukleaseinkubationen wurde für mehr als 30 Proben gereinigter replikativer M12 RNA bestätigt, bei denen die Schwankungsbreite nicht mehr als $\pm 1\%$ betrug.

Wenn man also annehmen kann, daß die Resistenz einer RNA gegen pankreatische Ribonuklease ein Maß für den Anteil an helikalen Basenpaarungen in ihr ist, also einen Index für ihre Sekundärstruktur darstellt, so läßt sich für die

hier referierten Resultate anstelle von Resistenz gegen pankreat. RNAase auch 'Doppelsträngigkeit' setzen. Die Folgerungen dieser Annahme für den Mechanismus der RNA-Replikation der kleinen RNA-Phagen werden später besprochen.

4. Bandsedimentationsanalyse der RNA

Als Methode für die differenzierte Analyse der einzelnen Intermediärformen wurde die Ultrazentrifugation der RNA vor und nach Deproteinisierung über lineare Rohrzuckergradienten gewählt. Bei dieser Methode werden Makromoleküle nach Masse und Gestalt getrennt.

Es ist klar, daß bei der Methode auch Interferenzen zwischen Molekülen, die wegen ihrer starren basengepaarten Struktur langsam sedimentieren und kleinen Einzelsträngigen Molekülen auftreten können (etwa M12-RF und Bruchstücke des Einzelstranges).

Man kann diese Komplikation umgehen, indem man RNA-Gele verwendet [BISHOP u.a. 1967]. Diese Gele trennen die RNA allein nach ihrer Masse und würden den RF klar von einzelsträngiger kurzer RNA unterscheiden. Derartige Gele verlangen jedoch eine Reinigung der Proben und benötigen zudem denaturierende Pufferzusätze wie SDS, wodurch diese Methode für die Untersuchung nativer RNA in dieser Arbeit nicht in Frage kam.

Zur besseren Auswertbarkeit wurden jedoch die sedimentierten Moleküle einer Digestion mit pankr. RNAase unterzogen (alternierend jede zweite Fraktion). Dadurch wurde eine bessere Unterscheidung zwischen doppel- und einzelsträngiger RNA möglich.

Wie Abb. 11 zeigt, ist nach drei Stunden Laufzeit der Gradienten bei 45 000 UpM eine deutliche Trennung der einzelnen hier interessierenden Fraktionen Einzelstrang, RI und RF möglich [27 S, 19 S und 15 S, vgl. FRANCKE und HOFSCHNEIDER 1966].

C. Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Gruppen

Eine Vielzahl von Experimenten, durch die ebenfalls die Sekundärstruktur der Replikationskomplexe kleiner RNA-Phagen geklärt werden sollte, ist bei BISHOP und LEVINTOW 1971 zusammengefaßt.

Ohne Ausnahme geben diese Experimente keinen Aufschluß über den Mechanismus der Replikation in vivo, weil es unmöglich war, die Struktur der nativen Replikationskomplexe zu bestimmen. Entweder wurden in vitro-Experimente durchgeführt, deren Aussagekraft für die in der infizierten Zelle herrschenden Verhältnisse limitiert ist. Oder aber mußte die RNA aus den infizierten Zellen mit Phenol bzw. Detergentien behandelt werden, was ebenfalls, wie wir zeigen konnten, die nativen Strukturen verändert. BISHOP und LEVINTOW zitieren in ihrer Übersichtsarbeit auf S. 50 zwar zwei Publikationen, bei denen die RNA aus den infizierten Zellen nur nach Einwirkung milder Detergentien untersucht worden sein soll. Bei genauer Analyse zeigt sich jedoch, daß bei beiden Veröffentlichungen die RNA mit Phenol gereinigt wurde.

ÖBERG und PHILIPSON, die lange Zeit für Poli-infizierte Zellen Replikationsformen beschrieben, die weitgehend doppelsträngig sind, nahmen in ihrer Arbeit von 1971 diese Befunde wieder zurück. Sie schützten ihre RNA vor Renaturierung bei der Reinigung durch Anwendung von Diäthylpyrophosphat (DEP) und maßen dann eine sehr geringe Resistenz gegen pankr. RNAse. Es ist bei diesen Ergebnissen jedoch nicht auszuschließen, daß DEP nicht nur die RNA schützt, sondern ihre Struktur auch verändert. Somit beweisen diese Experimente, obwohl das Poliovirus den kleinen RNA-Phagen sehr ähnlich ist, nichts für die reale Einzelsträngigkeit der replikativen Intermediärformen dieser Viren.

CRAMER und SINSHEIMER untersuchten 1971 die in vivo vorkommenden Ribonukleoproteinkomplexe (RNP) beim Phagen MS 2. Sie konnten zeigen, daß RNA, die sie aus den bei 65 S bandierenden RNP isolierten, nach Phenolisierung doppelsträngig wurde. Sie interpretieren diesen interessanten Befund jedoch von den an die RNA gehefteten Proteinen

her und nicht aus den Eigentümlichkeiten der Sekundärstruktur, die diese Strukturen offenbar besitzen und die sie befähigt, etwa nach Deproteinisierung zu renaturieren.

THACH und THACH unterzogen Replikationskomplexe aus R17-infizierten Zellen 1973 einer elektronenmikroskopischen Analyse. Sie konnten zeigen, daß die Mehrzahl der Replikationskomplexe Produktstränge besitzen, die nicht mit ihrer Vorlage basengepaart sind. Allerdings übersieht ihre Arbeitshypothese, daß es auch Replikationskomplexe gibt, die aus dem Template und nur einem fast fertiggestellten Produktstrang bestehen (RF-Vorläufer). Diese Moleküle kann ihre Methode nicht erfassen, was die Ergebnisse insgesamt relativiert. - Außerdem schließen sie nicht aus, daß Aktivitäten der RNAase III in ihren Zellextrakten vorhanden sind und die doppelsträngigen Anteile der Replikationskomplexe abbauen.

BOVÉ u.a. demonstrierten 1968, daß bei der in vitro - Synthese von RNA des Turnip Yellow Mosaic-Virus (TYMV) bereits vor der Deproteinisierung doppelsträngige Replikationsformen auftreten. Sie können jedoch nicht belegen, daß ihre Präparationsmethode, die im Einfrieren und Auftauen bestimmter Zellorganellen besteht, nicht zur Renaturierung dieser RNA führt.

Interessant ist der Befund, den BISHOP u.a. 1967 über die in vitro auftretenden RI's berichten. Sie maßen, daß auch beim negativen RI in mehr als 50% der Fälle Mehrfachinitiationen vorkommen. Dies Resultat weicht von unseren Untersuchungen ab. Man kann es sich jedoch damit erklären, daß in vitro keine Ribosomen die Replikase bei der Initiation der RNA-Synthese behindern, sodaß einer Mehrfachinitiation hier nichts im Wege steht.

Bei Abschluß dieses Manuskriptes erschien noch eine Arbeit zur genetischen Charakterisierung der von uns eingeführten Wirtsmutante AB 301-105 [APIRION und WATSON 1974]. Diese Publikation zeigt, daß die Extrakte dieser Bakterien tatsächlich frei von RNAase III sind. Offenbar wurde bei der Mutagenisierung, die zu dieser Mutante führte, gleichzeitig eine Reihe anderer Mutationen gesetzt, die für den

physiologischen Ausgleich dieser Mutation im Gen für die RNAase III sorgen. Diese Arbeit bestätigt jedoch voll die in den hier bei den Vorversuchen gebotenen Resultate.

D. Folgerungen aus den Resultaten dieser Arbeit:

Das Modell für die Replikation der RNA der kl. RNA-Phagen

Das Modell für den Mechanismus der RNA-Replikation in Zellen, die von kleinen RNA-Bakteriophagen infiziert wurden, hat sich nach zwei Hauptbefunden dieser Arbeit zu richten:

- a) Die Replikationskomplexe sind einzelsträngig, d.h. sie enthalten je einen Vorlagestrang und wachsende Produktstränge, die nur im Bereich der Replikase selbst mit dem Vorlagestrang durch Basenpaarung verbunden sind.
- b) Die Synthese der Minusstränge läuft über Replikationskomplexe, die in der Regel nur ein Molekül gleichzeitig synthetisieren.

Insgesamt ergibt sich für die RNA-Replikation der Picornaviren folgendes Bild: Die infektiöse RNA dringt in die Wirtszelle ein und wird vom Proteinsyntheseapparat der Zelle als Messenger akzeptiert. Es wird neben dem Hüllprotein sofort die phagenspezifische Untereinheit der Replikase translatiert. Sie verbindet sich mit drei wirtsspezifischen Proteinen: den Elongationsfaktoren der Translation T_S und T_U und dem Translationskontrollfaktor 'i' und konstituiert so das intakte Enzym.

In Gegenwart von Magnesium, zwei weiteren löslichen Wirtsfaktoren [KUO und AUGUST 1972] und den vier notwendigen Ribonukleosidtriphosphaten beginnt die Replikase mit der Synthese des Minusstranges. Dazu bindet sie an das 3'-Ende des Plusstranges und an den Initiationsort für die Translation des Hüllproteins, daß die Translation damit verbunden wird. Die RNA-Synthese verläuft dann vom 3' zum 5'-Ende des Plusstranges.

Nach Anlaufen der RNA-Synthese wird die Hemmung der Translation aufgehoben, deren erneutes Anlaufen zunächst die gleichzeitige Initiation durch ein weiteres Replikasemolekül ausschließt. Daher wird immer nur ein Minusstrang am Plusstrang synthetisiert.

Der Produktstrang ist in statu nascendi an seine Vorlage

durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen gebunden. Durch einen noch unbekannten Mechanismus wird er jedoch beim Fortschreiten der RNA-Synthese von seiner Vorlage getrennt (siehe S.95).

Der Minusstrang wird nach seiner Vollendung frei und dient wiederum als Vorlage zur Synthese neuer Plusstränge. Bei der Plusstrangsynthese benötigt die Replikase die löslichen Wirtsfaktoren nicht zur Initiation. Wie - der beginnt die Synthese am 3'-Ende der Vorlage. Häufig synthetisieren mehrere Replikasemoleküle gleichzeitig Plusstränge nach der Vorlage eines Minusstranges, da in diesem Fall keine Konkurrenz zwischen Ribosomen und dem Replikasemolekül möglich ist, da der Minusstrang keine mRNA ist. Durch solche Mehrfachinitiationen entstehen die schnell sedimentierenden RI's, die mehrere wachsende Produktstränge besitzen.

Die neusynthetisierten Plusstränge werden ebenfalls frei und dienen dann entweder zur Translation der Virusproteine, zur Synthese neuer Minusstränge oder werden in die Tochterphagen verpackt.

Schon während der RNA-Synthese bleiben einige Replikationskomplexe liegen. Sie renaturieren mit der Zeit und bilden doppelsträngige Moleküle nach der Art der klassischen RI- und RF-Struktur (Modell I Abb. 1). Dieser Vorgang kann in vitro auch durch Behandlung der replikativen RNA mit Phenol, Detergentien oder Wärme nachgeahmt werden.

In einigen Zellen werden die infizierenden Plusstränge (parentale RNA) wieder in Nachkommenphagen eingebaut.

Die Abb. 20 auf der nächsten Seite zeigt in einer schematischen Übersicht das Modell der RNA-Replikation in der durch M12-Phagen infizierten Zelle, wie es sich nach dieser Arbeit präsentiert.

E. Offene Fragen

Der Mechanismus der RNA-Replikation der Picornaviren ist nun grundsätzlich verstehbar, nachdem die wichtigsten Replikationskomplexe in ihrer Sekundärstruktur aufgeklärt sind und sich die kontroversen in vivo- und in vitro-Daten der Literatur in Zusammenhang bringen ließen. Einige Fragen bleiben jedoch offen.

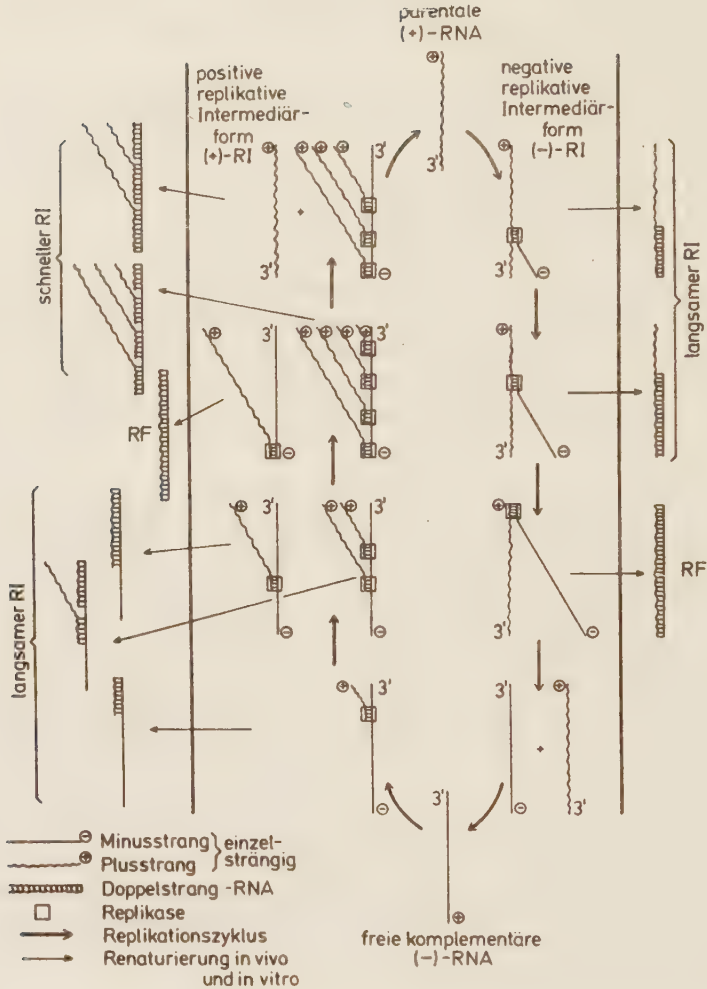


Abb. 20 Übersicht über den Replikationszyklus des kleinen RNA-Bakteriophagen M12. Das Mittelfeld der Grafik soll die einzelnen Replikationsformen darstellen, die aktiv in vivo an der RNA-Synthese beteiligt sind. Rechts und links sind die doppelsträngigen Intermediärformen zu sehen, die durch Renaturierung in vivo oder in vitro aus diesen hervorgehen.

Zunächst ist nach einer möglichen Funktion jener doppelsträngigen viralen Moleküle zu fragen, die nach 15 Minuten Markierungszeit bereits in vivo gebildet werden. Es wäre vorstellbar, daß diese teilweise renaturierten Moleküle bei der Steuerung der Translation eine Rolle spielen.

Man weiß etwa, daß beim freien Plusstrang das für die Translation des Reifungsproteins zuständige Cistron durch Faltung der RNA [LODISH 1970] für die Ribosomen nicht zugänglich ist [weitere Literatur zur Translationskontrolle der viralen Proteine bei HINDLEY und STAPLES 1969]. Dennoch wird dies Protein etwa im Verhältnis 1:200 im Bezug auf das Hüllprotein von der infizierten Zelle synthetisiert. Man kann sich nun vorstellen, daß die teilweise renaturierten Replikationskomplexe gerade das am 5'-Ende der neusynthetisierten Plusstränge liegende Cistron offen lassen (in der Zeichnung Abb. 20 trägt das 5'-Phosphatende der RNA-Moleküle immer das $\oplus$ - oder $\ominus$ - Zeichen). Denn bei der Renaturierung bleiben diese einzelsträngigen 'Schwänze' der Produktstränge normalerweise frei, wie auch Abb. 1a veranschaulicht.

Allerdings bieten auch die naszierenden positiven RI's die Möglichkeit der A-Protein-Translation, wie ROBERTSON und LODISH 1970 für in vitro synthetisierte naszierende Plusstränge zeigen konnten. Dafür sprechen auch eigene Beobachtungen, daß bei entsprechender Präparation in Gegenwart von Mg^{++} die replikative RNA zu mehr als 40% in der Polysomenfraktion sedimentiert, daß also die neugebildeten Plusstränge sofort nach ihrer Synthese auch translatiert werden.

Es steht auch noch die Erklärung des Mechanismus aus, mit dessen Hilfe der Produktstrang beim Fortschreiten seiner Synthese (RNA-Replikation) durch die Replikase (?) von seiner Vorlage getrennt wird. Man kann zwar spekulieren, daß ähnlich der Strangtrennung bei der DNA-abh. RNA-Polymerase die Replikase beim Weiterlaufen über die Vorlage durch ihren sterischen Bau den Produktstrang von der Vorlage abtrennt, diese Gedankengänge sind jedoch noch unbelagt.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das Zustandekommen der einzelsträngigen Replikationsformen bietet die Vorstellung, daß die Replikase mit dem 5'-Ende des Produktstranges verbunden bleibt und durch diesen Kreisschluß die beiden Stränge beim Fortschreiten der Synthese trennt. Dagegen spricht allerdings, daß dann wiederum das 5'-Ende nicht so leicht für die Translation des A-Proteins freiläge.

Eine Stabilisierung der einzelsträngigen Replikationskomplexe durch Proteine wurde vorgeschlagen, läßt sich aber nicht mit deren Abwesenheit in vitro vereinbaren, wo die Einzelstränge ebenfalls vorkommen.

Am wahrscheinlichsten ist immernoch die Modellvorstellung, daß die Replikase über einen besonderen Bau (etwa eine Art 'Dorn') die Produktstränge nach ihrer Synthese vom Vorlagestrang trennt und eine Renaturierung ähnlich wie der Zipper in einem Reißverschluß verhindert.

Wird jedoch die Replikase von dem Replikationskomplex entfernt (durch Deproteinisierung oder durch 'Pannen' bei der Replikation), so vermögen die beiden komplementären Stränge relativ leicht wieder zu renaturieren.

Interessant wäre auf jeden Fall eine Aufklärung der Raumstruktur der Replikase, um diese geforderten Mechanismen auch durch molekulare Daten belegen zu können.

Z u s a m m e n f a s s u n g

A. Ergebnisse der Arbeit

Diese Arbeit sollte den Mechanismus der RNA-Replikation in durch den Phagen M12 infizierten Bakterien aufklären. Dazu wurde die Struktur der in vivo auftretenden Intermediärformen der RNA-Replikation untersucht. Es zeigte sich:

1) Im Replikationskomplex ist der Produktstrang mit dem Vorlagestrang nur in unmittelbarer Nähe zum Replikationspunkt durch Basenpaarung verbunden.

2) Die Replikationskomplexe besitzen die Fähigkeit, in vitro durch Einflüsse wie Deproteinisierung oder Wärme Basenpaarungen über längere Strecken zwischen den Produktsträngen und den Vorlagesträngen auszubilden.

3) Dieser Vorgang kann auch in vivo bei solchen Intermediärformen ablaufen, die nicht (mehr) aktiv an der Replikation teilnehmen.

4) Replikationskomplexe, die Minusstränge synthetisieren, besitzen nur einen Produktstrang.

5) In einigen Zellen wird der infizierende Plusstrang wieder in Tochterphagen eingebaut.

B. Verwendete Methoden

Diese Ergebnisse wurden durch den Einsatz einer Bakterienmutante ermöglicht, deren Zellextrakt frei von störenden Ribonukleasen ist und somit die Untersuchung der nativen Replikationsformen erlaubt.

Die replikative virale RNA wurde durch Pulsmarkierung in Gegenwart von Rifampizin in vivo selektiv markiert.

Die basengepaarten Anteile zwischen Vorlage- und Produktstrang wurden durch Einsatz spezifischer Ribonukleasen ermittelt.

Die einzelnen Intermediärformen der RNA-Synthese wurden durch Bandsedimentation voneinander getrennt.

Die Replikationskomplexe, welche Minusstränge synthetisieren, ließen sich durch Einsatz radioaktiv markierter Phagen sowie durch Hybridisierungsexperimente identifizieren.

Literaturverzeichnis

- Avery, A.O.T., M.C.McLeod, M. McCarty [1944], J.exp. Med. 72, 137 ff.
- August, A.J.T., A.K. Banerjee, L. Eoyang, M.T. de Fernandez, K. Hori, C.H. Kuo, U. Ransing, L. Shapiro [1968], Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 73-81
- Amman J., H. Delius, P.H. Hofschneider [1964 a], Ber. d. Bunsenges. 68, 729-733
- Amman J., H. Delius, P.H. Hofschneider [1964 b], J.Mol. Biol. 10, 557-561
- Apirion D., N. Watson [1974], Molec. gen. Genet. 132, 89-104
- August A.J.T. [1969], Nature 222, 121-123
- Baltimore, D. [1971], Bact.Rev. 35, 235-241
- Billeter, A.M., M. Libonati, E. Viñuela, Ch. Weissmann [1966], J. Biol. Chem. 241, 4750-4757
- Bonin, O. [1973], Quantitative virologische Diagnostik, Thieme, Stuttgart, S. 39
- Blumenthal, T., T.L. Landers, K. Weber [1972], Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 1313-1317
- Bishop, M., L. Levintow [1971], Progr.in Medical Virology. Bd.13, S.1-82, Hrg. Melnick, J.L., Karger, Basel
- Borst, P., Ch. Weissmann [1965], Proc.Nat.Acad.Sci (Wash.) 54, 982-987
- Bertani, G. [1951], J.Bact. 62, 293-300
- Bové, J.M., Bové, C., Mocquot, B. [1968], Biochem. and Biophys. Res. Comm. 32, 480-486
- Cramer, J.H., R.L. Sinsheimer [1971], J.Mol. Biol., 62, 189-214
- Calendar, R., B.L. Lindquist, G. Sironi, A.T. Clark [1970], Virology 40, 72-83
- Davies, J.E., R.L. Sinsheimer [1963], J.Mol. Biol., 6, 203-207
- Delius, H., P.H. Hofschneider [1964], J.Mol. Biol. 10, 554-556
- Delius, H. [1966], Thesis München

- Doi, R.H., S. Spiegelman [1963], Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.)
49, 353-360
- Dunn, J.H., F.W. Studier [1973], Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.)
70, 3296-3300
- Eggen, K., D. Nathans [1969], J.Mol. Biol. 39, 293-305
- Enger, M.D., P. Kaesberg [1965], J.Mol. Biol. 13, 260-268
- Erikson, R.L., M.L. Fenwick, R.M. Franklin [1964], J.Mol.
Biol. 10, 519-521
- Erikson, R.L., E. Erikson [1967], J. Virol. 1, 523-528
- Erikson, R.L. [1968], Ann.Rev.Micorbiol. 22, S. 305-322,
Clifton, Ch.E. Hrg., Palo Alto
- Feix, G., H. Slor, Ch. Weissmann [1967], Proc.Nat.Acad.
Sci. (Wash.) 57, 1401-1408
- Fenwick, M.L., R.L. Erikson, R.M. Franklin [1964], Science
146, 527-530
- Franklin, R.M. [1966], Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 55, 1504-
1511
- Franklin, R.M. [1967], J. Virol. 1, 64-67
- Francke, B., P.H. Hofschneider [1966 a], J.Mol. Biol. 16,
544-552
- Francke, B., P.H. Hofschneider [1966 b], Proc.Nat.Acad.
Sci.(Wash.) 56, 1883-1890
- Francke, B., P.H. Hofschneider [1969], J.Mol. Biol., 40,
45-63
- Gesteland, R.F. [1966], J.Mol. Biol. 16, 67-84
- Godson, G.N., R.L. Sinsheimer [1967] Biochim.Biophys.Acta
149, 489-495
- Grandboulan, N., R.M. Franklin [1966], J.Mol. Biol. 22,
173-177
- Groner, Y., Pollack, Y., Berissi, H., Revel, M. [1972],
Nature New.Biol. 239, 16-19
- Hall, B.D., Ch. Weissmann [1961], Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.)
47, 137-146
- Hayward, W.S., F. de Fernandez [1971], Proc. Nucl.Ac.Res.
Bd.1, S.840-845, Cantoni, G.L., D.R. Davies,
Hrg., New York
- Hehlmann, R., P.H. Hofschneider [1970], J.Mol. Biol. 51,
225-246
- Heil, H.A., W. Zillig [1970], FEBS-Lett.11, 165-168

- D'Herelle, F.H. [1917], zit.nach Cairns, J., G.S. Stent,
J.D. Watson 'Phagen und die Entwicklung der Molekularbiologie', Berlin 1972
- Hindley, J., D.H. Staples [1969], Nature 224, 964
- Hindley, J. [1973] Progr. in Biophysics and Mol.Biol. 26,
Buttler, J.A.V., D. Noble, Pergamon, Oxford
- Hofschneider, P.H. [1963], Z.Naturforsch. 18b, 203-210
- Hofschneider, P.H., P. Hausen [1968], Molec.Basis of Vir.
S. 169-207, Fraenkel-Conrat, H. Hrg., Books,
New York
- Jacob, E., R. Jaenisch, P.H. Hofschneider [1970], Nature
227, 59-60
- Kamen, R., M. Kondo, W. Römer, Ch. Weissmann [1972], Eur.
J. Biochem. 31, 44-51
- Keil, T.U., P.H. Hofschneider [1973], Biochim.Biophys.Acta
312, 297-310
- Kelly, R.B., R.L. Sinsheimer [1967], J.Mol.Biol 26, 169-
179
- Kindler, P., T.U.Keil, P.H.Hofschneider [1973], Molec.gen.
Gen. 126, 53-59
- Kolakofski, D., Ch. Weissmann [1971], Nature New.Biol. 231,
42-46
- Kondo, M., R. Gallerani, Ch. Weissmann [1970], Nature 228,
525-527
- Konings, R., R. Ward, B. Francke, P.H. Hofschneider [1970],
Nature 226, 604-607
- Kuo, Ch.H., J.T. August [1972], Nature New Biol. 237, 105-
108
- Leipold, B., Thesis München, in Vorbereitung
- Lodish, H.F., N.D. Zinder [1966], J.Mol.Biol. 21, 207-209
- Lodish, H.F., [1970] J.Mol.Biol., 50, 689-702
- Lodish, H.F., [1971] J.Mol.Biol. 56, 627-632
- Loeb, T., N.D. Zinder [1961], Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.),
47, 282-289
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.I. Randall
[1951], J.Biol.Chem. 193, 265-275
- Matthai, H., A. Alsleben, H. Conle, M. Millberg, A. Parmeggiani, D. Swan [1967] 'PNPase aus Micrococcus lysodeicticus' in Kl.Prakt.d.biochemGen. Göttingen

- Meier, D., P.H. Hofschneider [1970], FEBS-Lett. 25, 179-183
- Montagnier, L., F.K. Sanders [1963], Nature 199, 664-667
- Nikolaev, N., L. Silengo, D. Schlessinger [1973], Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 70, 3361-3365
- Noll, N.M., N.H. Noll [1972], Nature New Biol. 238, 225-228
- Öberg, B., L. Philipson [1971], J. Mol. Biol. 58, 725-737
- Paranchynch, W., P.M. Krahn, R.D. Brandley [1970], Virology 41, 465-473
- Philipson, L., P. Albertson, G. Frick [1970], Virology 11, 553
- Robertson, H.D., R.E. Webster, N.D. Zinder [1968], J. Biol. Chem. 243, 82-91
- Robertson, H.D., H.F. Lodish [1970], Proc. Nat. Sci. Acad. (Wash.) 67, 710-716
- Schäfer, S.R., W. Zillig, H. Priess [1972], FEBS-Lett. 25, 86-90
- Schreier, M.H., T. Staehlin, R.F. Gesteland, P.F. Spahr [1973], J. Mol. Biol. 75, 575-578
- Schuster, H., G. Schramm, W. Zillig [1956], Z. Naturforsch. 11b, 339-345
- Sinsheimer, R.L., B. Starman, C. Nagler, S. Gunthrie [1962] J. Mol. Biol. 4, 142-160
- Spahr, P.F. [1966] in Procedures in Nucleic Acid Res. 1, 64-78, Cantoni and Davies, Hrg., New York
- Spiegelman, S., N.R. Pace, D.R. Mills, R. Levisohn, T.S. Eikhom, M.M. Taylor, R.L. Peterson, D.H.L. Bishop [1968], Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 101-124
- Thach, S., R.E. Thach [1973], J. Mol. Biol. 81, 367-380
- Travers, A.A., R.J. Kamen, R.F. Schleif [1970], Nature 228, 748-751
- Twort, X. [1915], zit. nach Cairns, J. u.a. 'Phagen und die Entw. d. Molekularbiol.', Berlin 1972
- Valentine, R.C., H. Wedel [1965], Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 106-112
- Ward, R., R.N.H. Konings, P.H. Hofschneider [1970], Eur. J. Biochem. 17, 106-115

- Weissmann, Ch., P. Borst [1963], Science 142, 1188-1191
- Weissmann, Ch., P. Borst, M.A. Billeter, S. Ochoa [1964]
Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 51, 682-690
- Weissmann, Ch., S. Ochoa [1967] in Progr.in Nucl.Ac.Res.
and Mol.Biol., S.353-399, Davidson J.N. Hrg.,
Academic Press., New York
- Weissmann, Ch., G. Feix, H. Slor [1968], Cold Spring Har-
bor Symp.Quant.Biol. 33, 83-100
- Weissmann, Ch., M.A. Billeter, H.M. Goodman, J. Hindley,
H. Weber [1973], Ann.Rev.Biochem. 42, 303-328,
Snell, E.E. Hrg., Palo Alto
- Zillig, W., E. Fuchs, R.L. Milette [1966] in Procedures
in Nucl.Ac.Res. S.323-339, Cantoni and Davies
Hrg., New York

LEBENS LAUF

Geboren am 9. März 1942 als Sohn des kaufmännischen Direktors Walther Keil und seiner Frau Lucie, geborenen Bremer in Frankenberg/Niederschlesien besuchte ich nach Umsiedlung unserer Familie in den Jahren 1948 bis 1956 die Grundschule in Rostock und bis 1958 die dortige Oberschule.

Im Juni 1958 verließ unsere Familie die DDR. Bis zum Jahre 1961 war ich Schüler am Staatl. Aufbaugymnasium in Rüthen/Möhne, wo ich im März 1961 die Reifeprüfung ablegte.

In den Jahren 1961 bis 1966 studierte ich Systematische Philosophie in Berlin und Pullach bei München, wo ich das philosophische Studium mit dem Lizentiat in Philosophie abschloß. Es folgte ein Jahr Assistententätigkeit an der Pullacher Hochschule im Fach Naturphilosophie.

Zum Sommersemester 1966 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München, legte dort am 30.7.1968 die mündliche Diplomprüfung und am 9.12.1971 die Diplomhauptprüfung im Fach Biologie ab.

Seit dem Wintersemester 1970/71 arbeitete ich im Labor von Prof. Dr. med., Dr. phil. P.H. Hofschneider am Max-Planck-Institut für Biochemie in München und Martinsried/München an molekularbiologischen Fragen zur Replikation des kleinen RNA-Bakteriophagen M12, woraus die Diplomarbeit Ende 1971 und das vorliegende Manuskript hervorgingen.

Seit März 1972 bin ich mit meiner Frau Adrienne, geborenen Ochsner, verheiratet.

Seit April 1974 redigiere ich die medizinische Fachzeitschrift 'Ärztliche Praxis' in Gräfelfing/München als wiss. Redakteur für naturwissenschaftliche Grenzgebiete zur Medizin.

In der Zeit von April 1969 bis zum Juli 1974 förderte die Studienstiftung des Deutschen Volkes meine Ausbildung durch ein Stipendium

